

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

**ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE CIENCIAS
BIOLOGICAS**

**DEPARTAMENTO ACADEMICO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS**



**GENOTIPIFICACION DE VIH-1 EN PACIENTES CON TERAPIA
ANTIRETROVIRAL BASADO EN UNA PORCION GENETICA DE LA
TRANSCRIPTASA REVERSA.**

**Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en Biología
Celular y Genética**

Presentado por:

Bach. Pedro Miguel Chávez Huapaya

Asesora:

Blga. Margarita Velásquez Reinoso

2007

El presente trabajo de investigación fue realizado en el marco del proyecto:
“Identificación Molecular de mutaciones puntuales relacionadas a
resistencia a drogas en VIH-1”. A cargo del Blgo. Carlos Augusto Yabar
Varas en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología y Biología
Molecular del Instituto Nacional de Salud.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A mi familia, con especial reconocimiento a mi madre, que ha sabido comprender mis altos y bajos en el avance de esta tesis y a quien le debo todo lo que soy y todo lo que ahora estoy construyendo.

Al Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud en las personas del Sr. Blgo. Carlos Yabar, mi asesor de tesis y al Sr. Blgo. Omar Cáceres Rey. De igual forma, muy especiales y cariñosos agradecimientos a la Sra. Técnico de Laboratorio Juana Choque Portilla y al Sr. Técnico de Laboratorio David García Neyra quienes me apoyaron profesionalmente en la realización del presente trabajo de tesis.

A Karen, Giselly, Stella y Carlos Padilla que me apoyaron a seguir adelante durante mi estancia en el laboratorio.

A la Sra. Blga. Margarita Velásquez Reinoso, mi asesora interna de tesis, quien me ha apoyado en continuar con el presente trabajo hasta su finalización.

Mi agradecimiento y reconocimiento personal al Instituto de Educación y Salud (IES) especialmente a Carmen Murguía, Alina Anglas Cárpena, Fiorella Dávila, José Gaona, Rina Paredes, Elmer Vidal, Javier Baca y Peggi Monzón así como a todas y todos las y los chicos voluntarios del Proyecto Punto J con quienes he trabajado y a los que adoro por ser mi motor y cambiar mi vida desde que los tengo en ella.

A José Luis, mi amigo y hermano a quien admiro, quiero y estimo pues me ha dado y da alegría, fomentando con su amistad mis esfuerzos por seguir caminando y por estar aun en los momentos más difíciles que me ha tocado vivir hasta el momento.

A Oscar Quispe, mi amigo personal y a todos los chicos de JADE por acogerme, apoyarme y brindarme un primer espacio de expresión, orientación, amistad y crecimiento, así como por mostrarme una nueva realidad siendo ellos mi modelo en el activismo TLGB.

A Fernando Cisneros por su siempre brillante sonrisa, por sus siempre atinados comentarios, por ser admirable en todo lo que hace, por tener siempre algo que decirme y por no dejar de ser mi amigo.

Tabla de Contenidos

	Página
I. Resumen	5
II. Abstract	6
III. Introducción	7
IV. Antecedentes	11
V. Material y Métodos	40
VI. Resultados	56
VII. Discusión	82
VIII. Conclusiones Finales	88
IX. Recomendaciones	89
X. Referencias Bibliográficas	90

GENOTIPIFICACION DE VIH-1 EN PACIENTES CON TERAPIA ANTIRETROVIRAL BASADO EN UNA PORCION GENETICA DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA.

I.- RESUMEN

Con el propósito de genotipificar las mutaciones de resistencia a antiretrovirales existentes en una porción de la Transcriptasa Reversa (TR) del Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 Subtipo B (codones 151 a 261), se colectaron once muestras (n=11) provenientes del Comité de Prevención y Control de SIDA (COPRECOS) del Hospital Militar Central como parte del proyecto: “Detección de Mutaciones Puntuales en VIH-1 relacionadas a Resistencia a Antiretrovirales”. Todas las muestras se sometieron a amplificación por PCR y secuenciamiento mediante el método de Sanger para proceder al análisis de las mutaciones con el Software HIV db versión 4.1.2 de la Universidad de Stanford (disponible *online*). De acuerdo a los resultados de genotipificación de la secuencia parcial de la TR, sólo dos de las 11 muestras presentaron mutaciones primarias relacionadas a resistencia a antiretrovirales, el resto de muestras mostraron mutaciones de tipo compensatorias para posiblemente alguna otra mutación fuera de esta región genética de la TR, encontrándose además algunos otros polimorfismos. Este es el primer estudio en el Perú que demuestra la presencia de mutaciones de resistencia en sujetos con tratamiento a antirretrovirales usando un sistema de genotipificación de VIH desarrollado en laboratorio.

II.-ABSTRACT/ SUMMARY

In order to genotype the resistance mutations to antiretrovirals drugs from a portion of the Reverse Transcriptase (RT) from the Human Immunodeficiency Virus 1 Subtype B (codons 151 to 261), eleven samples coming from the “Committee of Prevention and Control of AIDS” (COPRECOS) were collected from the “Hospital Central Militar” as part of the Project: “Detection of Punctual Mutations in HIV-1 related to resistance to antiretrovirals drugs “. All samples were subjected to amplification by PCR and sequencing trough the Sanger method. Then RT sequences were analyzed using the HIV db Software version 4.1.2. from Stanford University (available online). According to genotyping results of the partial sequence of RT only two samples were found to have punctual primary related to resistance mutations for antiretroviral drugs, the remainder samples showed some mutations that might be compensatory to other mutations abroad of this RT genetic region and also finding some other polimorfisms. This is the first study made in Peru that detects punctual resistance mutations from patients receiving antirretroviral treatment by using genotyping system entirely developed in laboratory.

III.-INTRODUCCION

En nuestro país, el primer caso de SIDA se ha reportado en el año 1983, desde entonces hasta el mes de noviembre del 2006 las estadísticas oficiales de la Oficina General de Epidemiología del Ministerio de Salud (OGE 2006) revelan 18773 casos notificados de SIDA y 26276 personas infectadas por el VIH. La vía de transmisión más frecuente es la vía sexual con un 97% de los casos, la transmisión vertical 2% y la transmisión sanguínea 1%, siendo los varones de entre 25 a 29 años los que mantienen el pico mas alto de incidencia con 3065 casos frente a 805 de la población femenina en el mismo rango de edades (OGE 2006). De acuerdo al Consejo Internacional de Organizaciones que trabajan con VIH/sida (ICASO 2005) en 22 años de epidemia la incidencia acumulada se concentra en el departamento de Lima y la provincia constitucional del Callao.

Entre 1983 y el 2002, Lima ostentaba el 67.5% de la población total infectada con VIH. En julio del 2003 el 67%, disminuyendo a 66.5 % en julio del 2004 y recrudeciendo en octubre del 2005 con 73%. Hasta marzo del 2006 la incidencia acumulada en Lima es de 43.33 % notando que entre 1983 y el 2005 Lima tiene una incidencia acumulada de casos notificados de 65.35 % (OGE 2006), lo cual permite observar que más de la mitad de portadores del país se encuentran concentrados en nuestra capital.

Uno de los frentes de la estrategia nacional para hacer frente al VIH-sida es el tratamiento antiretroviral. Desde el Ministerio de Salud se brinda tratamiento antiretroviral en dos líneas, *Naive* o primera línea y *Rescate* o segunda línea (ICASO 2005). Las respuestas a la terapia de aquellas personas que reciben tratamiento se circunscribe a la evaluación de la carga viral y el conteo de las poblaciones CD4+ y CD8+ (Norma Técnica para el Tratamiento Antiretroviral de Gran Actividad – TARGA en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana 2004), en ese sentido, la decisión de mantenimiento o cambio de terapia es manejada en base a la reducción de la carga viral, efectos colaterales diferenciales, interacción de medicamentos, tolerancia de los pacientes y esquema de dosificación de las drogas antiretrovirales prescritas.

En nuestro país, de acuerdo a la Norma Técnica para el Tratamiento Antiretroviral de Gran Actividad – TARGA en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (2004), el TARGA se aplica en los siguientes casos:

- 1.- En todo paciente sintomático, que se encuentre dentro de la clasificación B ó C (B: estadio sintomático y C: Sida) del CDC (US. *Center for Disease Control and Prevention*), independiente de los niveles de CD4 y carga viral, los cuales deben ser obligatoriamente realizados para el seguimiento y monitorización de el TARGA.

- 2.- En todo paciente con niveles de carga viral mayor a 55 000 copias/ml o recuento de Células T CD4 menor a 200 cel/mm³, independiente de las manifestaciones clínicas.
- 3.- En todos los pacientes asintomáticos con un recuento de células T CD4 igual o mayor de 200 cel/mm³, la decisión de ingreso a el TARGA será definido por el comité de expertos siempre y cuando cumpla con las siguientes condiciones:
 - Carga viral mayor o igual a 55 000 copias/ml.
 - La caída significativa del recuento de células T CD4 igual o mayor de 100 cel/mm³ monitorizada cada 3 meses, y carga viral mayor o igual a 55 000 copias/ml.
- 4.- Los pacientes asintomáticos con recuento de células T CD4 por encima de 200 cel/mm³ y CV menor a 55,000 copias/ml deberán ser monitorizados por el especialista regularmente cada 3 ó 6 meses desde el punto de vista clínico, inmunológico y virológico a fin de evaluar la progresión de la infección .

Como se aprecia, no existe un paso dentro del protocolo de atención que haga mención a la genotipificación de mutaciones de resistencia, por lo que se ingresa a tratamiento desconociendo las posibles implicancias que un esquema de medicamentos traería sobre una población viral resistente, a pesar de que ya existe y se sigue acumulando nueva información respecto a las mutaciones en VIH-1 relacionadas a resistencia a drogas y su importancia en la práctica clínica (D'Aquila et al 2002). Ello trae como consecuencia que los sujetos infectados continúen el tratamiento desde un punto de vista netamente clínico sin la respectiva información genotípica del agente viral (Arrizabalaga et al 2002).

La genotipificación del VIH ya ha sido empleada a nivel de Latinoamérica y el Caribe. Existen reportes sobre subtipificación basados en genotipificaciones efectuadas en Argentina, Brasil, Cuba y Venezuela (Russell et al 2000). Del mismo modo un estudio mas reciente realizado entre 1995 y el año 2002 ha reportado los subtipos de VIH-1 en Argentina, Bolivia, Colombia, Chile, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela. Es necesario resaltar que el objetivo de dichos estudios no ha sido el de identificar mutaciones que podrían ser relacionadas a resistencia a antiretrovirales (Laguna et al 2005). Dicha resistencia sería consecuencia de la tasa de mutación de la Transcriptasa Reversa del VIH-1 (definida como el número de bases incorrectamente incorporadas por nucleótido y por ciclo de replicación) que es del orden de 10^{-3} a 10^{-5} sustituciones / nucleótido/ ciclo replicativo) (Domingo E.1997) así como de la presión selectiva que la terapia antiretroviral ejerce sobre el virus, manifestada en la aparición de cuasiespecies resistentes a los medicamentos (Hironori et al 2000). Es así que la ausencia de una metodología de genotipificación de mutaciones contribuye al desconocimiento de la epidemiología molecular de cepas de VIH resistentes a antirretrovirales, lo cual trae además la imposibilidad de mejorar

la terapia personalizada de sujetos infectados y más aún, la incapacidad de identificar nuevos casos de multiresistencia en cepas de VIH y su distribución en la población infectada. Por tanto, es necesario identificar mutaciones de resistencia en pacientes peruanos a fin de brindar nueva información a nivel de Latinoamérica. Conocer las mutaciones y polimorfismos compensatorios de interés terapéutico en genes virales a lo largo del tratamiento antiretroviral, podría permitir el desarrollo de terapias individualizadas que estén de acuerdo con la respuesta particular de cada paciente y con la subpoblación viral genotípicamente identificada mediante técnicas de biología molecular adecuadas y desarrolladas en laboratorio.

En el Perú algunas entidades como la “Asociación Civil Impacta Salud y Educación” y el “*Naval Medical Research Center (NMRC)*” ya se encuentran ejecutando, independientemente uno de otro, la genotipificación en hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH; éste término incluye a hombres homosexuales, bisexuales, transgéneros y hombres heterosexuales con prácticas sexuales homosexuales) y trabajadoras sexuales (TS), con apoyo de laboratorios de los Estados Unidos de Norteamérica donde es realizado el respectivo análisis.

Hoy en día existen ensayos de genotipificación comerciales, la mayoría de ellos solamente amplifican y secuencian el gen de la proteasa así como el extremo 5' final de la Transcriptasa Reversa y en algunas ocasiones tienen problemas detectando subtipos que no son B (cabe aclarar que el VIH tipo 1 posee 10 subtipos, desde la A hasta la H, J y K; para mayor detalle ver Variabilidad Genética del VIH, pag 25) así como mutaciones no consideradas en el kit de genotipificación.

Con tal propósito se ha desarrollado el presente trabajo de tesis eligiendo como población de estudio a pacientes con valores por encima de 400 copias de ARN de HIV-1 o por debajo de 200 cel/ul, como indicadores de una respuesta no satisfactoria al tratamiento y por consiguiente posibles indicadores de portar genotipos resistentes.

Mediante la presente investigación, se intenta brindar información nueva que permita encaminar el desarrollo e implementación de una metodología de genotipificación con proyección a ser usada como rutina, desarrollada en laboratorio (sin emplear un kit comercial) que permita mejorar la calidad de tratamiento así como la calidad de vida de las personas que viven con VIH/SIDA.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General:

- ✓ **Genotipificar** una porción genética del VIH-1 correspondiente a la Transcriptasa Reversa en pacientes que ya reciben tratamiento antiretroviral.

Objetivos Específicos:

- ✓ **Estandarizar** la amplificación específica de una región de aproximadamente 300 pb de la porción polimerasa de la Transcriptasa Reversa de VIH-1 a partir de muestras clínicas de sujetos peruanos infectados.
- ✓ **Definir** la secuencia genética de la región estudiada en la población de sujetos infectados.
- ✓ **Identificar** las mutaciones puntuales que puedan ser relacionadas a resistencia a ARVs mediante el uso de programas de análisis de ADN y diferenciarlas de mutaciones compensatorias y cambios polimorficos simples.

IV.- ANTECEDENTES

SOBRE EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un retrovirus, ya que su estructura básica corresponde a la del llamado “prototipo de retrovirus”, el cual consiste de los genes gag, pol y env que codifican las proteínas necesarias para el ensamblaje de viriones así como las enzimas requeridas para la replicación e inserción del genoma (Miller et al 2000). El virus es diploide y presenta dos copias de Acido Ribonucleico (ARN) de aproximadamente 9 Kb como material genético que será copiado en ADN bicatenario con capacidad de ser integrado en el núcleo de la célula infectada (Hjuler et al 2005). El VIH es también un lentivirus, ya que comparte genes importantes con otros lentivirus animales tales como el Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (VIS) o el Virus de la Inmunodeficiencia Felina (VIF), la **TABLA 1** muestra los genes que el VIH comparte con otros virus. Adicionalmente, el VIH posee la capacidad de desarrollar latencia, un estado de infección no productivo y reversible tal y como pasa con los virus del Herpes, en sus diferentes variantes (Miller et al 2000).

TABLA 1. Genes compartidos por diferentes retrovirus animales, incluyendo al VIH.

Virus	Huésped	Inmuno deficiencia	Enfermedad	Linfotrópico	Viremia	Organización Genómica						
						<i>rev</i>	<i>tat</i>	<i>vif</i>	<i>vpr</i>	<i>vpr/vpx</i>	<i>vpu</i>	<i>nef</i>
VIH-1	Humanos	Si	Si	Si	Si	✓	✓	✓	✓		✓	✓
VIH-2	Humanos	Media	Media	Si	Si	✓	✓	✓		✓		✓
SIV	Monos	Si	Si	Si	Si	✓	✓	✓	✓	✓		✓
FIV	Gatos	Si	Si	Si	Si	✓		✓				
EIAV	Caballos	No	Si	No	Si, intermitente	✓	✓	-	-	-	-	-
CAEV	Cabras	No	Si	No	Si	✓	✓	✓	-	-	-	-
Visna virus	Ovejas y	No	Si	No	Si	✓	✓	✓	-	-	-	-
	Cabras											
BIV	Ganado	No	No	Si	? ^b	✓	✓	✓	-	-	-	-

El gen *rev* está conservado entre todos los lentivirus, *tat* y *vif* están conservadas en todos los lentivirus primates y son comunes a todos los lentivirus no primates con excepción de FIV (*tat*) y EIAV (*vif*).

?^b Indica que el virus puede estar presente pero bajo el nivel de detección.

Adaptado de Miller et al 2000. Human Immunodeficiency Virus and AIDS: Insights from Animal Lentiviruses.

Estructura Molecular y Genoma

La morfología del VIH de acuerdo a las microfotografías electrónicas es icosaédrica y provista de numerosas proyecciones. Presenta una cápside, la cual está cubierta de una membrana fosfolipídica que el virus obtiene a partir de la célula hospedera a través del mecanismo de esporulación o escape hacia el medio extracelular. En la superficie de membrana se encuentran embebidas proteínas estructurales denominadas proteínas de la envoltura. Entre ellas figuran dos glicoproteínas de 120 y 41 KD de peso molecular denominadas gp 120 y gp 41. Ambas son las responsables en reconocer a los receptores CD4 de los linfocitos así como también diversos ligandos de la célula a ser infectada que en su conjunto permitirán el ingreso e internalización del VIH (Yabar C. 2003). La gp 41 ancla a gp 120 en la bicapa, en cuyo interior se encuentra la cápside consistente de las proteínas de cápside (CA) p17 y p18 que cubren por completo el núcleo viral o core. Las paredes del core están hechas de las proteínas p24 y p25 y contienen a las dos copias de ARN de cadena simple (ssARN) y aproximadamente 50 moléculas de transcriptasa reversa (EDVOTEK. The Biotechnology Education Company 2000). En la figura 1 se presenta una forma simplificada de un virión VIH-1 y en la figura 2 se muestra la nucleocápside y su contenido.

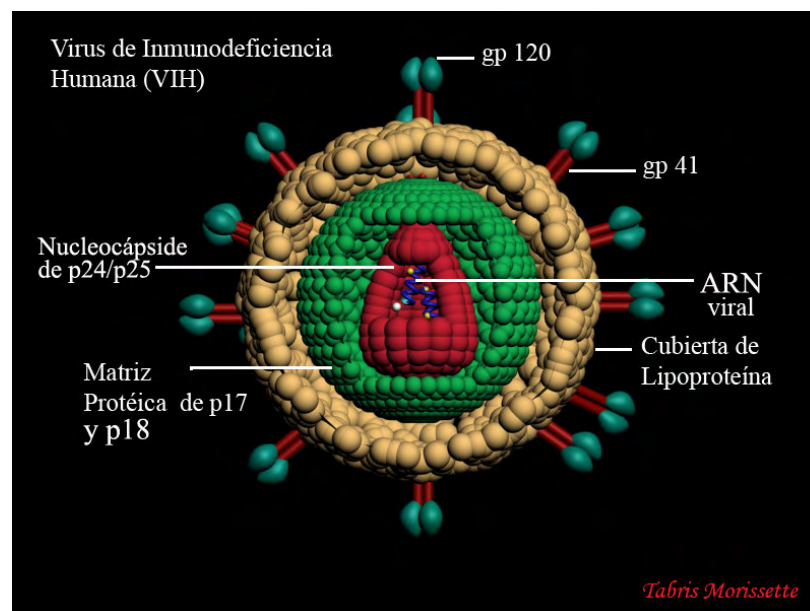


Figura 1. Virión Simplificado de VIH.

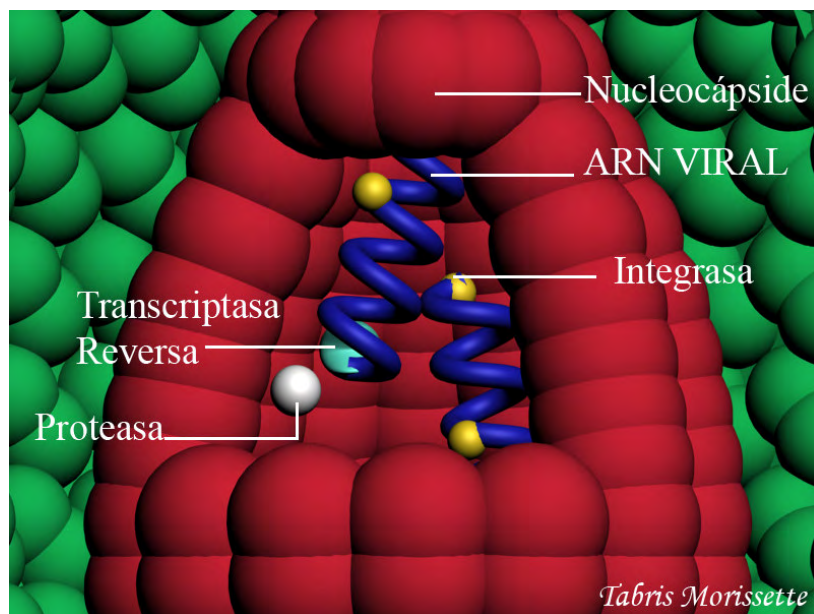


Figura 2. Detalle de la Nucleocápside y su contenido.

El genoma del virus comprende dos hebras de ARN de un tamaño aproximado de 9.2 y 9.7 Kilobases (Kb). Está compuesto de tres regiones genéticas: *gag*, que codifica proteínas estructurales del núcleo o core, *env* que codifica glicoproteínas de la envoltura y *pol* que contiene secuencias que codifican la enzima transcriptasa reversa, endonucleasa y proteínas virales necesarias para la replicación viral. Al mismo tiempo estas regiones contienen de manera superpuesta seis marcos de lectura correspondientes a genes que codifican proteínas no estructurales de singular importancia para ciertas funciones biológicas de el virus (figura 3) (revisado por Yabar C. 2003). Los genes: *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* son genes regulatorios adicionales que codifican las llamadas proteínas accesorias que actúan in vivo como factores críticos de virulencia. *Nef* es expresado a partir de un mRNA cortado y procesado por lo que es independiente de *rev*. El VIH también codifica una proteína transactivadora (Tat) y una proteína Rev (reguladora de transporte y procesamiento de ARN) común a todos los lentivirus conocidos (Miller et al 2000). En la **TABLA 2** puede apreciarse una lista de las proteínas del VIH y SIV (Virus de Inmunodeficiencia del Simio), con su respectiva función.

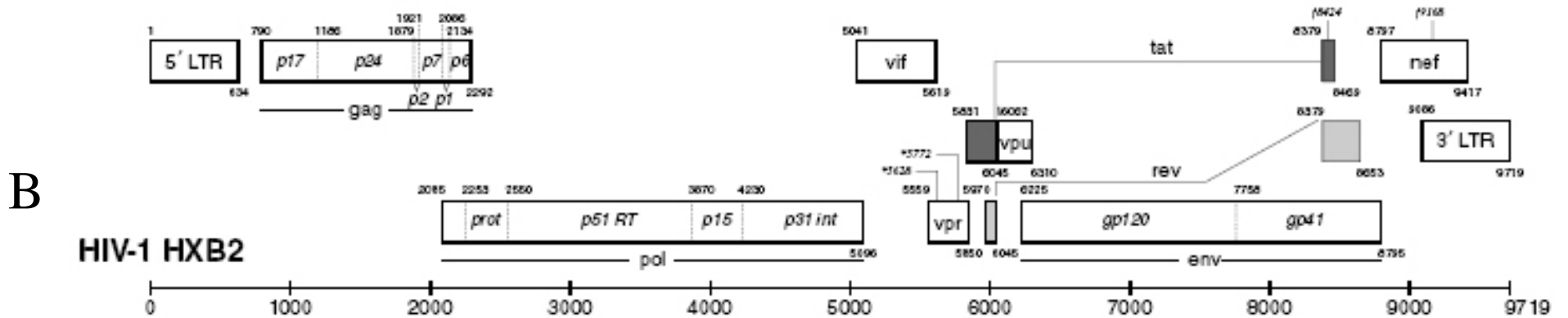


Figura 3. El genoma del VIH. A) El genoma simplificado, se muestran los tres genes principales *gag*, *pol* y *env* así como las regiones LTR, tomado de Yabar C. 2003. B) Mapa genético del VIH-1 HXB2, se aprecia en detalle la ubicación de cada gen dentro de los genes mayores *gag*, *pol* y *env*. Tomado de HIV Molecular Biology 2005

TABLA 2. Proteínas del VIH/SIV

Nombre	Tamaño	Función	Localización
Gag MA	p17	Anclamiento a membrana; interacción con env; transporte nuclear del núcleo viral (proteína miristilada)	Virión
CA	p24	Núcleo de la Cápside	Virión
NC	p7	Nucleocápside, une ARN	
	p6	Une Vpr	
Proteasa(PR)	p15	Maduración y clivaje de gag/pol	
Transcriptasa Reversa (TR)	p66,p51 (heterodímero)	Transcripción Reversa, actividad ARNasa H	
Integrasa(IN)		Integración del Provirus de DNA	
Env	gp120/gp41	Glicoproteínas virales externas que se unen al receptor CD4 y co-receptores de Quimioquinas	Membrana plasmática, envoltura del virión
Tat	p16/p14	Transactivador viral transcripcional	Primariamente en el nucleolo/núcleo
Rev	p19	Transporte de ARN, estabilidad y utilización de factor (Fosfoproteína)	Primariamente en nucleolo/núcleo yendo y viniendo entre el nucleolo y el citoplasma
Vif	p23	Factor de Infectividad viral, inhibe la hipermutación de la hebra negativa de DNA viral	Citoplasma (membranas, citosol), virión
Vpr	p10-p15	Promueve la localización nuclear del complejo de preintegración, inhibe la división celular, mantiene las células infectadas en	Núcleo del Virión, posiblemente también en la membrana nuclear
Vpu	p16	Promueve la liberación extracelular de partículas virale, degrada CD4 en el Retículo Endoplasmático;(Fosfoproteína solamente en VIH)	Proteína integral de membrana
Nef	p27-p25	Bajo regulación de CD4 y Clase I (proteína miristilada)	Membrana plasmática, citoplasma, probablemente virión
Vpx	p12-16	Homólogo de Vpr presente en VIH-2 y algunos SIV, ausente en VIH-1	Virión, probablemente en núcleo
Tev	p28	Proteína tripartita tat-env-rev (también llamada Tnv)	Primariamente en nucleolo/núcleo

Adaptado de HIV Molecular Immunology 2005.

La secuencia codificante de VIH-1 se encuentra flanqueada por dos secuencias de repeticiones terminales largas o LTR (Long Terminal Repeat). Estas secuencias son el punto de convergencia para factores de transcripción y elementos de la maquinaria transcripcional del hospedero así como de las proteínas codificadas por el virus que enaltecen o modulan la expresión de proteínas y ARN viral. Estructuralmente las secuencias LTR tienen una longitud de 640 pb y están segmentadas en 3 regiones bien diferenciadas y conocidas como U3, R y U5 (Yabar C. 2003). La región U3 es la región moduladora y posee elementos de control transcripcional, los cuales incluyen: un promotor núcleo, core o región central que lleva consigo la caja TATAA que recluta ARN polimerasa II. Elementos potenciadores (*enhancers*) que incluyen sitios de unión para factores de transcripción celular como NFAT (factores nucleares de Células T activadas) y NF- κ B (factor nuclear kappa-beta) los cuales actúan hiperregulando la expresión de los genes de VIH-1 en respuesta a la estimulación celular por una variedad de vías incluyendo citoquinas exógenas y activación de células T (figura 4).

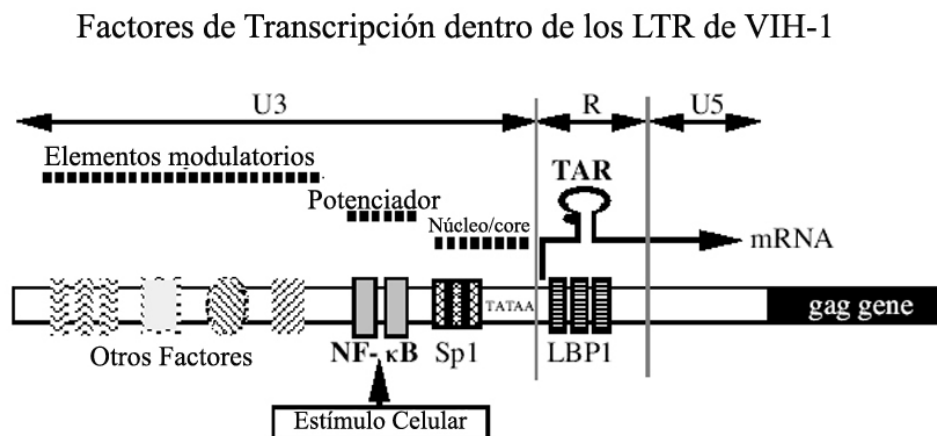


Figura 4. Esquema de uno de los LTR (Long Terminal Repeat) de VIH-1. Se detallan las regiones U3, R y U5. Para mayores detalles leer el texto. Adaptado de Luciw, capítulo 60, Virology Fields, 3rd Edn.

El segundo segmento conocido como región R del LTR presenta secuencias de respuesta transactivadora a las que se une la proteína viral Tat (Yabar C. 2003). Los productos de transactivación de VIH-1 son de dos tipos: Tat y Rev (VIH-2 produce las proteínas homólogas Tax y Rex), ambas proteínas están codificados por mRNA múltiplemente cortado. En contraste, los oncoretrovirus simples sólo codifican mRNA sin procesamiento, sin cortes, o mRNA de un solo corte, es decir, procesados una sola vez.

La membrana lipídica del VIH es derivada del hospedero y posee estructuras triméricas, conocidas también como espículas de envoltura, las cuales son codificadas por el virus; estas

consisten de dos diferentes glicoproteínas gp120 y gp41, dicha estructura está formada por puentes intramoleculares no covalentes. En cada una de ellas se distinguen un capuchón y un tallo, un trímero de moléculas gp 120 conforma el capuchón y el tallo se forma de un trímero de moléculas gp41 anclado a la bicapa lipídica viral (Greenberg et al. 2004). La figura 5 ilustra este párrafo.

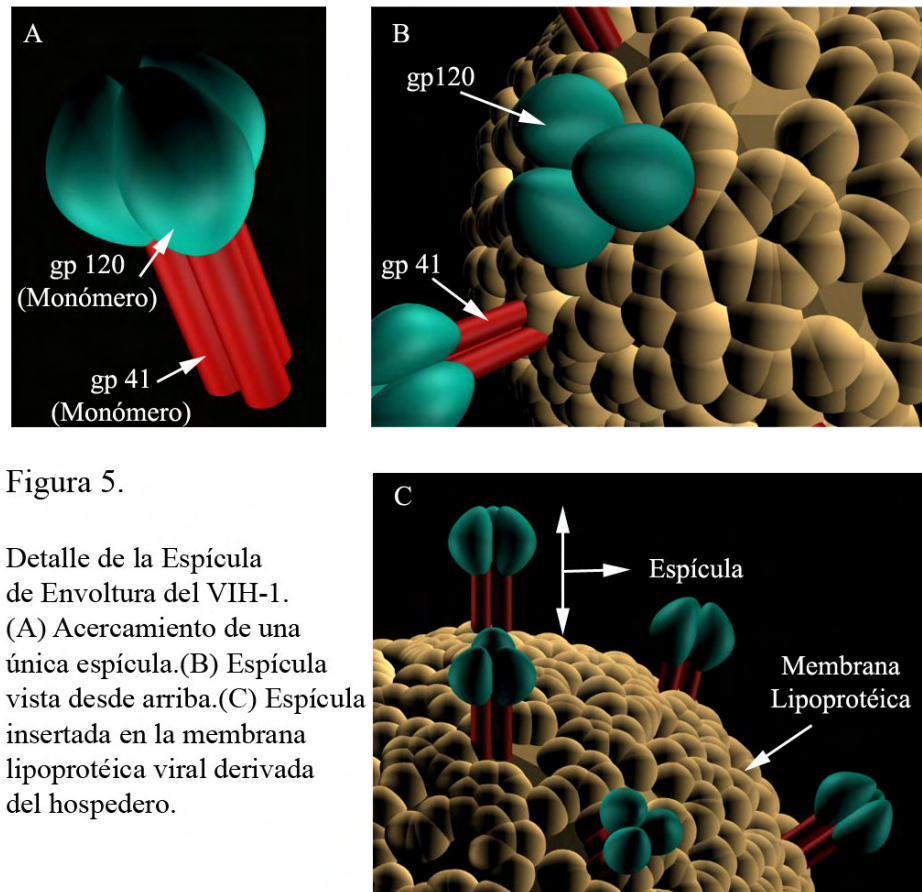


Figura 5.

Detalle de la Espícula de Envoltura del VIH-1. (A) Acercamiento de una única espícula. (B) Espícula vista desde arriba. (C) Espícula insertada en la membrana lipoprotéica viral derivada del hospedero.

De otro lado, el trímero gp120 puede oscilar entre dos conformaciones transicionales: abierto, en el cual los lazos variables V1, V2 y V3 de gp 120 (variable loops) bloquean el acceso a la región de unión a CD4 y co-receptores; in vivo el trímero estaría en el estado cerrado reduciendo la afinidad por CD4 pero protegiendo la región contacto del ataque de los anticuerpos (Ab) (Ugolini et al 1999). Estas estructuras son fundamentales pues son las que hacen el contacto del virus con la célula hospedera.

La Infección por VIH -1

Fases Iniciales de la Infección por VIH-1

El virus atraviesa el epitelio dañado e infecta a las células de Langerhans y a las células dendríticas que se encuentran en el epitelio estratificado. Estas células son presentadoras de Antígeno (APC) y expresan en su superficie DC-sign (*Dendritic Cell signs*), una lectina a la que el virus se adhiere y que es responsable de que el virus sea transportado al líquido linfático por la migración de las APCs. Experimentos realizados en animales demuestran que la infección de estas células ya es evidente a las 24-72 horas de la infección. En las 24 a 48 horas siguientes las células dendríticas infectadas migran a los ganglios linfáticos regionales donde, en los centros germinales, activan e infectan gran cantidad de linfocitos CD4, amplificando en forma explosiva la infección y producción viral. La carga viral se expande de forma exponencial, se duplica cada 0.3 días durante las 2-3 semanas de la infección y se alcanza el pico más elevado en plasma, secreciones genitales y otros compartimientos a las 4 semanas de la infección. En menos de una semana el virus se disemina vía sanguínea por todo el cuerpo de manera que cuando el paciente seroconvierte el reservorio viral ya ha sido establecido (Miró et al 2004). La figura 6 grafica los eventos secuenciales de la infección desde que el virus ingresa al organismo.

El VIH-1 se replica continuamente aún durante el prolongado y asintomático periodo Ventana, entre la infección primaria y el desarrollo de la fase SIDA. Durante la fase asintomática hay típicamente 10^4 a 10^5 copias de plasma viral (ARN/ml) (Persaud et al 2003).

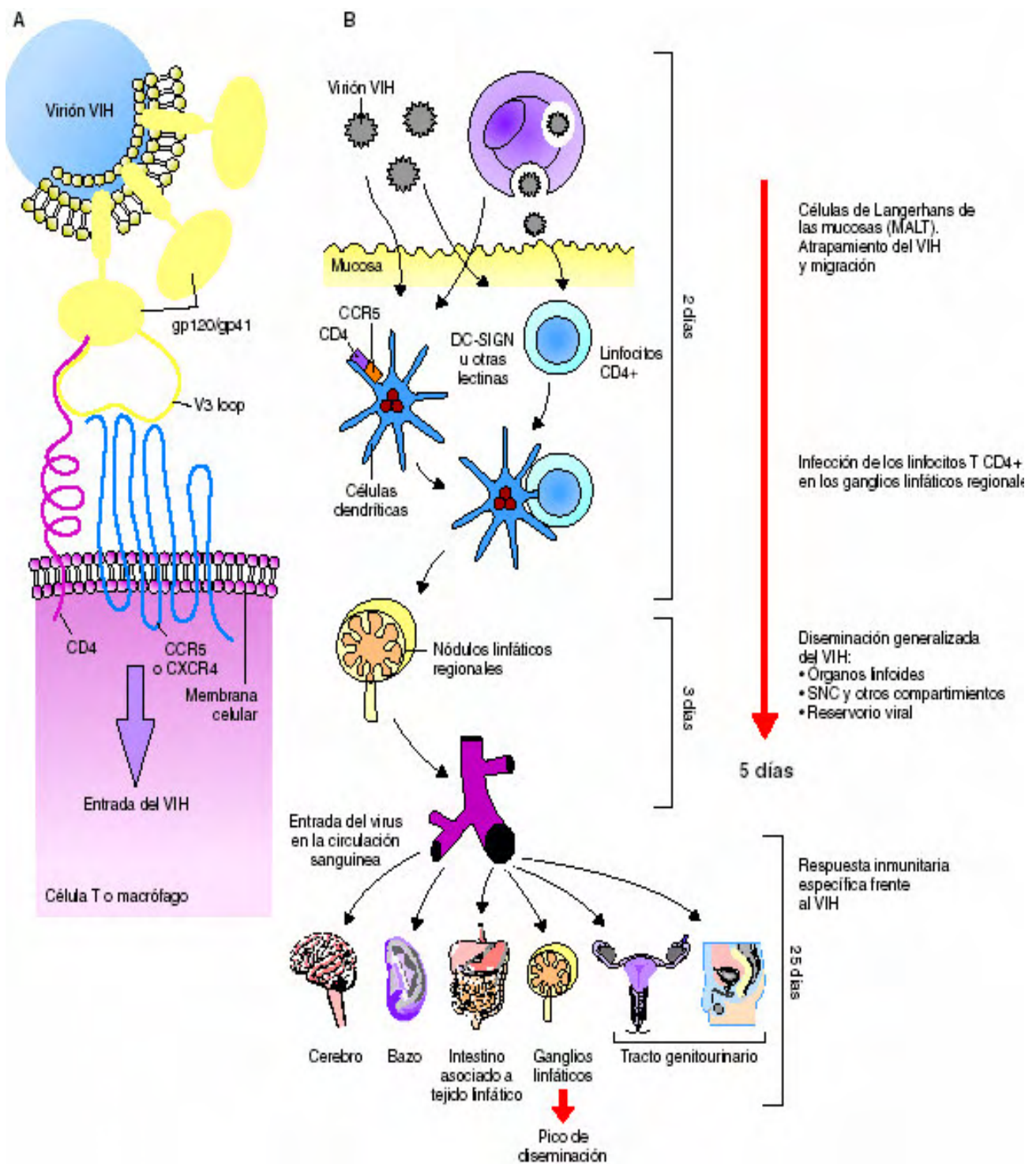


Figura 6. Transmisión de la infección por VIH y establecimiento de los reservorios.

A) Interacciones entre las glucoproteínas de envoltura del VIH y la molécula CD4 y los correceptores CCR5 o CXCR4, fusión y entrada del VIH. B) Secuencia inicial de la infección por el VIH adquirida por vía sexual hasta la diseminación viral (adaptado de Miró et al 2004).

En nuestro país, desde el punto de vista clínico y bajo las normas de la CDC (Center for Disease Control and Prevention) , se consideran tres estados: asintomático (A), sintomático (B) y SIDA (C) (Norma Técnica para el Tratamiento Antiretroviral de Gran Actividad – TARGA en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana 2004). La **TABLA 3** presenta la manera en la que las personas que viven con VIH-sida son clasificadas respecto a su estado clínico y carga viral.

TABLA 3: Sistema de Clasificación Revisada de Infección por VIH y Definición de Caso de SIDA para Vigilancia de Adolescentes y Adultos 1993

Categorías según Células T CD4	Categorías Clínicas		
	Asintomático, Infección Primaria (aguda) o LPG	Sintomático, pero no en condición A o C	Condiciones Indicadoras de SIDA
	A	B	C
1. ≥ 500 cel/mm ³	A1	B1	C1
2. 200 – 499 cel/ mm ³	A2	B2	C2
3. <200 cel/ mm ³ conteo de linfocitos indicador SIDA	A3	B3	C3

Fuente: MMWR Morb Mortal Wkly rep. 1992; 41(RR – 17):1 – 19

Tomado de “Norma tecnica para el Tratamiento Antiretroviral de Gran Actividad – TARGA en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana 2004”.

Eventos moleculares de la Infección por VIH-1

El ciclo de replicación del VIH inicia con la interacción de la proteína gp 120 y el dominio VI del extremo N Terminal del receptor CD4 de la célula hospedera (células T y otros tipos celulares susceptibles). El receptor CD4 se localiza a nivel de macrófagos, linfocitos T, células dendríticas y de Langerhans (Yabar C. 2003). Esta interacción resulta en el cambio conformacional de gp 120 que le permite unirse al receptor de Quimioquinas que sirve como co-receptor de entrada viral (Ugolini et al 1999). CCR5 y CXCR4 son los más importantes co-receptores de VIH-1 (Greenberg et al. 2004), prueba de ello es que aunque CD4 es necesaria para la infección por VIH, su expresión por si sola no es suficiente para hacer a una célula susceptible al virus, por ejemplo, las células de Glioma humano que no expresan CD4 y mediante técnicas de laboratorio son inducidas a hacerlo, no logran ser infectadas por el VIH, de esta manera el VIH requiere de cofactores los cuales son receptores de Quimioquinas. Al inicio de la infección, es decir durante la fase aguda de la infección (hasta los 28 días después de que el virus ingresó al organismo) predominan las llamadas cepas virales R5 o no productoras de sincitio, que son aquellas que para infectar requieren la presencia del co-receptor CCR5 (Miró et

al 2004). CCR5 es usado por la mayoría de aislados de VIH, incluyendo a la mayoría de cepas sexualmente transmitidas de VIH-1 por lo que anteriormente recibían el nombre de cepas M-trópicas. Este co-receptor permite al virus infectar células T así como macrófagos y células de Langerhans que se encuentran en mucosa y epitelio. Los ligandos naturales de CCR5 son β -Quimioquinas: RANTES (Regulated upon Activation Normal T- Expressed and Secreted), MIP-1- α , MIP-1- β y quimioquinas derivadas de macrófagos (MDC: macrophage-derived chemokine), estas moléculas y por tanto derivados sintéticos pueden bloquear la infección por parte de las cepas R5 de HIV-1, sin embargo, RANTES es incapaz de inhibir la adsorción a la línea celular T CD4⁺ CCR5⁺ (Ugolini et al 1999). En contraposición, las cepas que aparecen en estadios avanzados de la infección requieren de la expresión del factor CXCR4 por lo que se denominan cepas X4 o productoras de sincitio (Miró et al 2004), hoy se sabe que existen cepas Monotrópicas, es decir que tienen tropismo por uno de los dos co-receptores o bien por cualquiera de los dos siendo estas cepas de Tropismo Dual, los virus que infectan usando a CCR5 se continúan transmitiendo y persisten durante toda la infección, las cepas X4 han sido ligadas con la progresión más rápida hacia la fase SIDA y el declinar del conteo CD4 (Greenberg et al. 2004).

El paso final en el proceso de entrada viral es la fusión, este es un mecanismo complejo que termina con la liberación de la cápside viral en el citoplasma de la célula hospedera (Greenberg et al 2004). Antes de la fusión, en la conformación nativa, el ectodominio de gp41 está cubierto por gp120. La secuencia aminoacídica de gp41 predice cuatro regiones de trascendente importancia funcional esquematizadas en la figura 7.

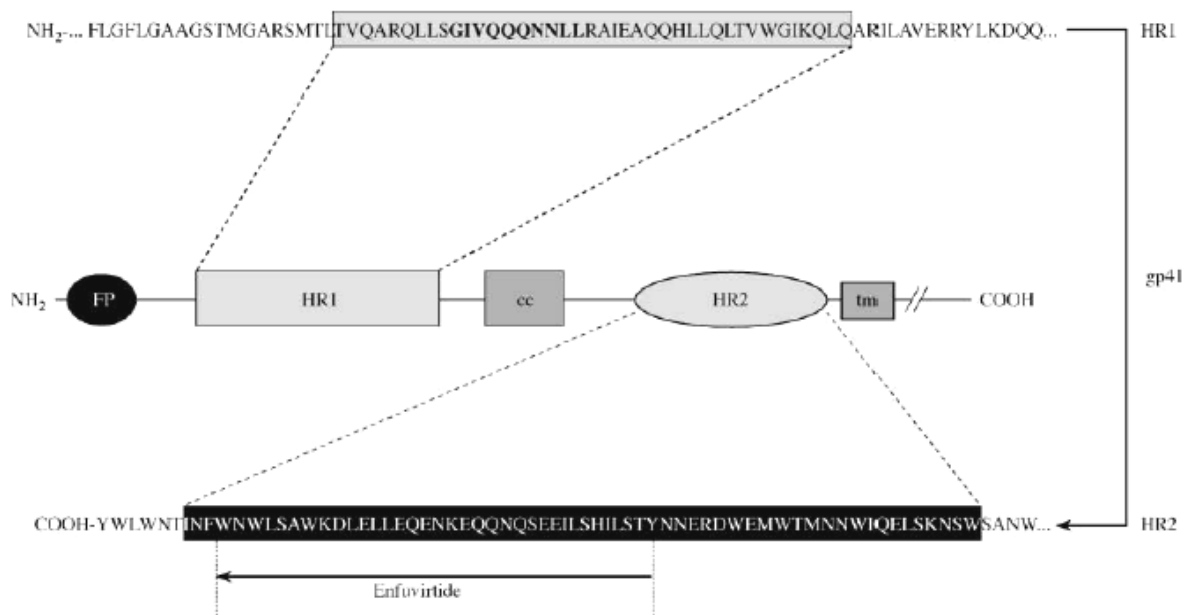


Figura 7. Esquema lineal de gp41. Se representan cuatro regiones de importancia funcional: (FP) péptido fusión, Repetición Heptad (HR1) o Hélice N Terminal, Residuos de cisteína (cc) que forman los puentes disulfuro, Repetición Heptad 2 (HR2) o Hélice C Terminal y la región Transmembrana (tm). Las secuencias de aminoácidos de HR1 y HR2 son mostradas en detalle. Los aminoácidos involucrados en la interacción entre HR1 y HR2 se muestran en negrita, esta gráfica incluye a aquellos aminoácidos que se cree son parte de la resistencia al inhibidor de fusión Enfuvirtide. Adaptado de Greenberg et al 2004.

Gp 41 contaría con una región transmembrana que ancla la proteína en la membrana viral, dos regiones conocidas como Repeticiones Heptad HR1 y HR2 o bien N- HR y C- HR o Hélices N Terminal y C Terminal respectivamente las cuales se definen como un tipo de secuencia de repetición en tandem en las que un grupo de 7 aminoácidos se repite muchas veces dentro de la secuencia proteica ,estas repeticiones Heptad muestran hidrofobicidad periódica predictiva propia de las estructuras α -helicoidales que pueden unirse, ello para formar un trímero de repeticiones Heptad antiparalelas también conocidas como “six helix bundle”, paquete de seis hélices o estructura en horquilla (hairpin structure) y una región peptídica de fusión que es capaz de pinchar y traspasar la membrana. Una vez formada la estructura en horquilla es estabilizada por puentes disulfuro intramoleculares. La transición a esta conformación alterada, junta a las membranas celular y viral y promueve la inserción del péptido fusión N-terminal dentro de la membrana celular. La evidencia sugiere que la agregación de muchos trímeros de envoltura insertados en la membrana celular crea un poro mediante el cual la cápside viral puede pasar (Greenberg et al 2004).

Una vez que la cápside ha ingresado al citoplasma se inicia el proceso de replicación viral. Dicho proceso inicia con la transcripción del genoma viral en ADN a partir de ARN, proceso realizado por la enzima Transcriptasa Reversa.

SOBRE LA TRANSCRIPTASA REVERSA Y LA REPLICACIÓN VIRAL

La Transcriptasa Reversa (TR) del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) es la enzima viralmente codificada que convierte el ARN de cadena simple (single stranded: ssARN) del genoma viral en ADN de doble cadena (Julias et al 2003). El bloqueo de la transcripción reversa previene la síntesis del ADN viral y de ésta manera también la subsecuente integración del genoma viral en el ADN celular, trayendo como consecuencia el aborto de la infección. Es por tal razón que la TR, ha sido desde el principio del desarrollo de los tratamientos antiretrovirales (TARV) considerada como un blanco atractivo para la inhibición pues es crucial para los estadios tempranos del ciclo replicativo del VIH (Alon et al. 2003).

La TR es un heterodímero consistente de una subunidad de 66 Kilo Daltons (KD) y una de 51 KD (Wang et al 1994). Esta enzima es además conocida por ser multifuncional pues posee dos actividades polimerasa, dependiente de ARN (RDDP: RNA dependent DNA polimerase) y dependiente de ADN (DDDP: DNA dependent DNA polimerase) así como actividad de Ribonucleasa H (ARNasa H) función que le permite degradar el ARN original ya transcrito (Xin et al 2003).

La subunidad p66 contiene ambos dominios, Polimerasa y ARNasa H, evidencia de ello es que el clivaje proteolítico de p66 remueve el dominio ARNasa dejando la subunidad p51 (Wang et al 1994). La subunidad p51 es procesada por clivaje proteolítico de p66 y corresponde al dominio polimerasa de p66. Las porciones de ambas, p51 y p66 pueden ser descritas como una “mano derecha” que contiene tres subdominios: dedos, palma y pulgar. El subdominio de conexión conecta la mano del dominio polimerasa y el dominio ARNasa H en p66 el cual provee la actividad de ribonucleasa. Aunque p51 posee a su vez un dominio de conexión, carece de dominio ARNasa H. Los subdominios de conexión y palma contienen tres hojas Beta plegadas con una Alfa hélice en un lado, los subdominios pulgar abarcan tres Alfa hélices. Los cuatro sub dominios polimerasa de la TR de VIH-1 tienen diferentes orientaciones en las dos sub unidades del heterodímero (figura 8).

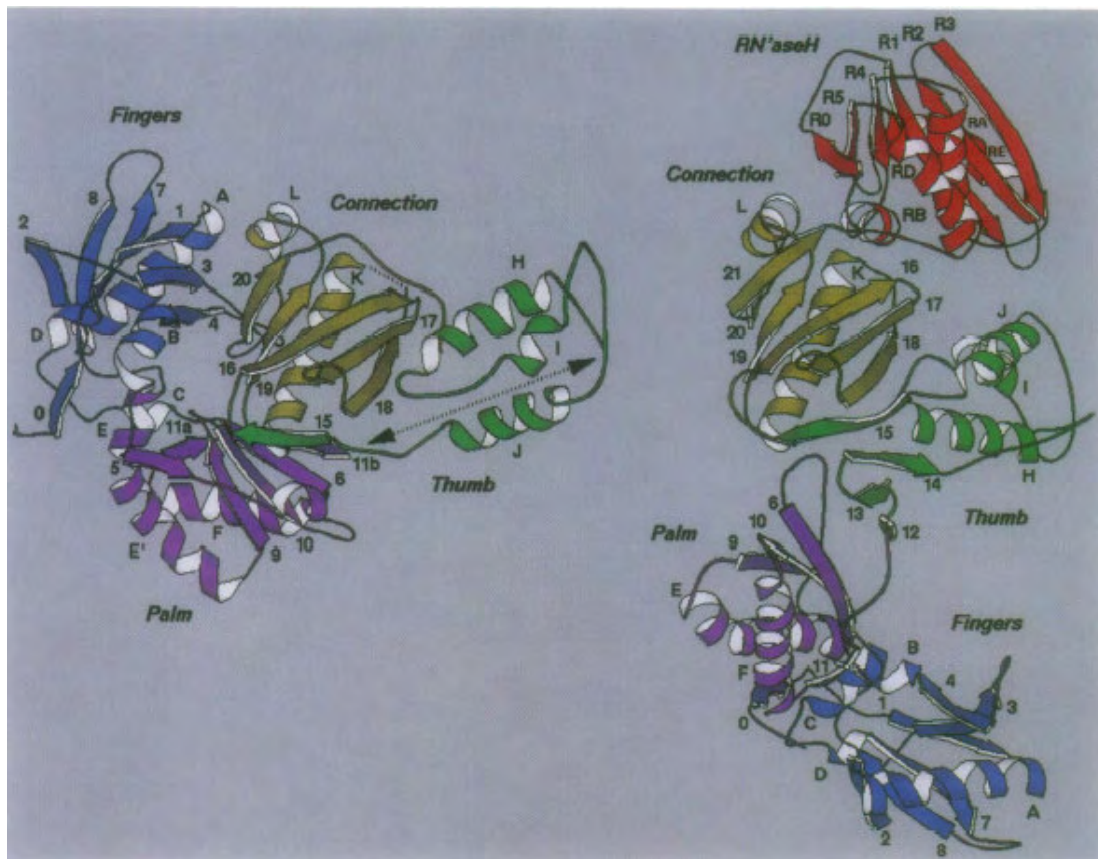


Figura 8. Dibujo esquemático (tomado de MOLSCRIPT) del esqueleto polipéptido de las subunidades p51 (izquierda) y p66 (derecha) con el dominio de conexión de las dos subunidades orientadas en forma idéntica. Las α -hélices están nombradas por letras en forma secuencial a partir del extremo N-terminal y las hojas β están numeradas. La estructura secundaria de la ARNasa H está etiquetada como fue descrita por Davies et al 1991. La diferencia más dramática en la estructura de estas dos subunidades es la posición de los subdominios dedos y palma en relación al dominio de conexión. En p66 el subdominio de conexión no hace contacto con los dedos de p66 y casi ninguno con la palma, mientras que el subdominio de conexión de p51 tiene contacto extensivo con ambos. Parte de la superficie del subdominio de conexión formado por las hélices A y K y las hojas β 16,19 y 20 interactúan con los dedos y palma en p51 pero hacen contactos intersubunidad en la subunidad p66. Connection: Dominio de Conexión. Fingers: dedos. Palm: palma. Thumb: pulgar. RNase H: ARNasa H. Adaptado de Wang et al 1994.

La subunidad p51 tiene una estructura compacta a la cual nos podemos referir como “cerrada”, mientras que p66 tiene una estructura más extendida con una larga hendidura a la cual nos podemos referir como “abierta” con los dominios de conexión orientados en forma idéntica. Las interacciones entre las dos sub unidades son por completo asimétricas, el dominio de conexión de p51 involucra a diferentes residuos aminoacídicos que los presentes en el dominio de conexión de p66. Los contactos entre sub dominios de conexión forman las únicas interacciones entre los subdominios equivalentes de cada unidad, los contactos entre los dos subdominios de conexión son intrínsecamente asimétricos y muchos residuos equivalentes hacen diferentes interacciones proteína-proteína (figura 9) (Wang et al 1994).

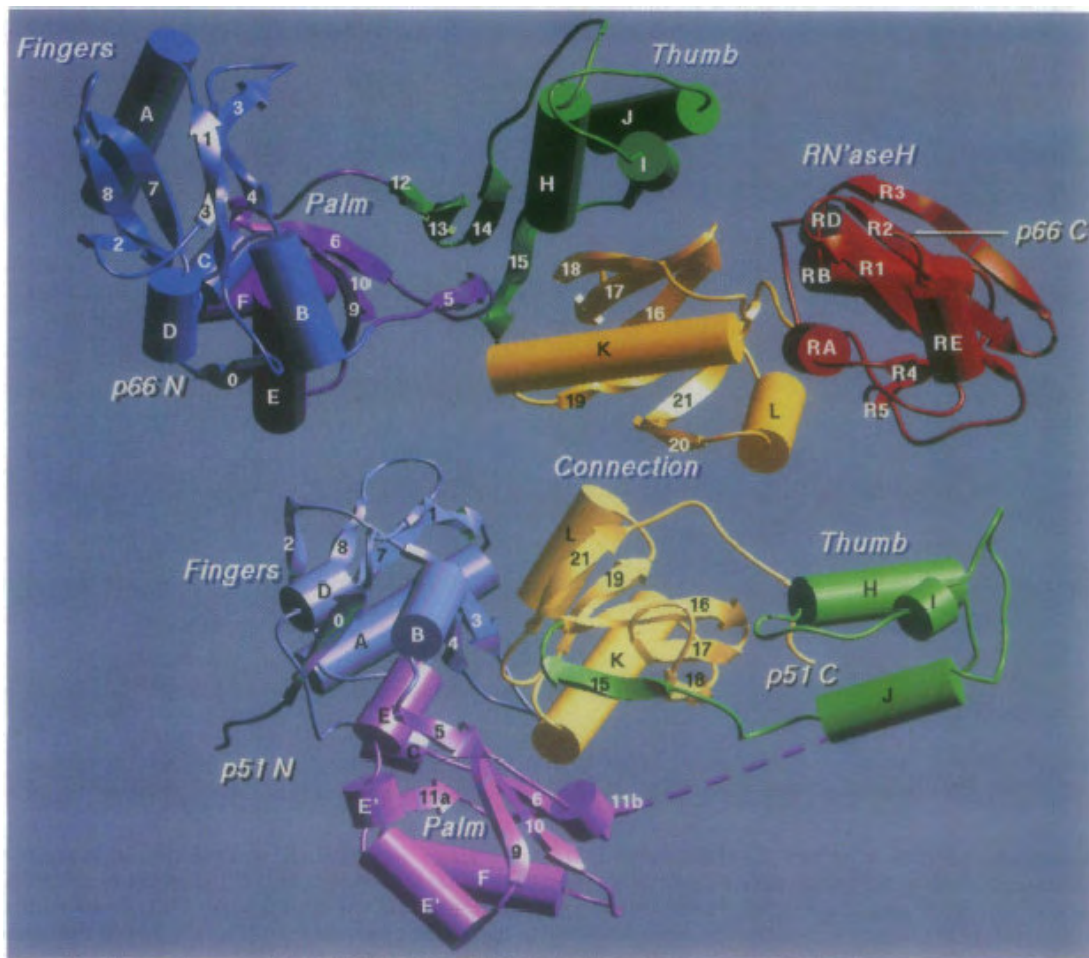


Figura 9. Dibujo esquemático del esqueleto polipeptídico del heterodímero de la Transcriptasa Reversa (TR) de VIH-1 creado con el programa RIBBONS. Las α -hélices y las Hojas β están representadas por tubos y flechas respectivamente. Los subdominios están nombrados y coloreados como en la figura 10 que muestra las subunidades por separado y en igual orientación respecto a sus dominios de conexión. Las sub unidades p66 (superior) y p51 (inferior) están puestas en dirección vertical para hacer clara la interacción entre superficies. Adaptado de Wang et al 1994.

En adición al rol estructural de unir los dominios ARNasa H y polimerasa de p66, se cree que el dominio de conexión tiene un rol modesto en unir y posicionar al ácido nucleico que será transcrito, alineando los dominios de forma que ambos sitios activos (polimerasa y ARNasa H) puedan contactar simultáneamente el sustrato de ARN-ADN. Existen aminoácidos en el dominio de conexión tanto de p51 como de p66 que hacen contactos específicos con el ácido nucleico, por parte de p51 encontramos a los residuos K395 y E396 que tocan el ADN así como K390 que contacta el ARN molde, en tanto que en el dominio de conexión de p66 son G359, A360, H361 y T362 quienes contactan con el ADN (figura 10).

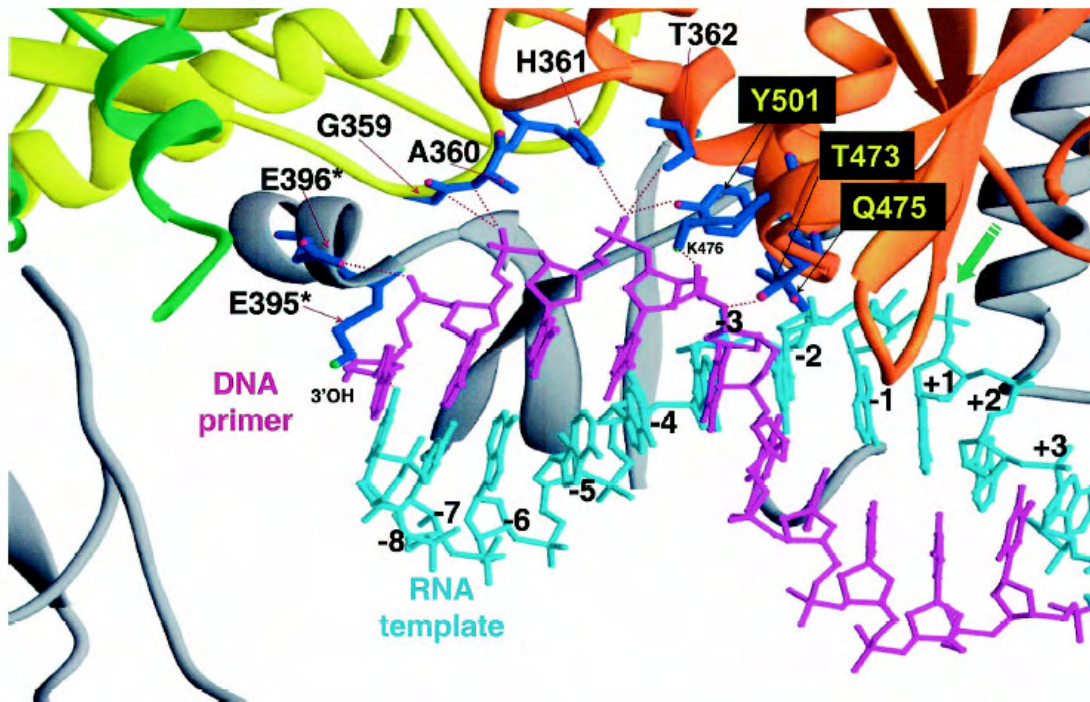


Figura 10. Diagrama de la estructura de la TR de VIH-1 en complejo con un molde ARN-ADN cuya secuencia es derivada del Tracto de Polipurinas (PPT). La figura muestra la porción de la estructura cerca al sitio activo de la ARNasa; los contactos entre el ácido nucleico, el dominio de la ARNasa H y el dominio de conexión están indicados. La cadena de ARN molde es mostrada en turquesa, la cadena de ADN cebadora o iniciadora es mostrada en lila. El fosfato que se cortará está designado por una flecha verde. El dominio ARNasa H está representado en naranja, el sub dominio de conexión es mostrado en amarillo. El pulgar está en verde. La subunidad p51 está en gris. Los aminoácidos en p51 que contactan los ácidos nucleicos están marcados con un asterisco al costado del número de posición. Los aminoácidos que contactan al ácido nucleico están etiquetados. Los contactos entre aminoácidos individuales y el ácido nucleico están representados en rojo. La cadena de ARN está numerada respecto al sitio de clivaje. (Adaptado de Julias et al 2003)

También se sabe que las mutaciones en el dominio de conexión tienen generalmente efectos pequeños en los títulos virales, no así las mutaciones H361 y E396A que con la mutación Y501, esta en el dominio RNAasa, afectan tanto el título viral como la especificidad de clivaje de la ARNasa H (Julias et al 2003).

La generación de ADN viral de longitud completa se da en varios pasos y requiere de la degradación de un híbrido ARN-ADN por parte de la ARNasa H y de dos secuencias molde interruptoras o reacciones de transferencia de cadena que parecen ser estimuladas por proteínas de nucleocápside (NC). Cationes divalentes y desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) son necesarios para la elongación del molde que procede lentamente comparado a como lo hacen otras polimerasas, ello se cree que es el resultado del obstáculo parcial esteárico que ofrecen los complejos de transcripción reversa a la actividad de la TR de VIH-1. Los complejos de transcripción reversa serían conglomerados del ácido nucleico molde, enzima Transcriptasa Reversa, Integrasa, proteínas de la cápside y algunas proteínas celulares que no han sido determinadas aún. La síntesis de la cadena de ADN de polaridad negativa (minus strand DNA) es iniciada por un tARN parcialmente desplegado el cual está alineado con el genoma viral. La

cadena de ADN positiva es sintetizada usando la cadena de ADN de polaridad negativa como molde e inicia en el tracto de polipurinas (PPT), una región en el genoma que es resistente a la degradación por parte de la ARNasa H y que actúa como iniciador o cebador. Es interesante notar que VIH-1 y otros retrovirus poseen un PPT extra en la región central del genoma. Como la transcripción reversa procede, se forma una pequeña región de solapamiento entre el final 5' y el final 3' de la creciente cadena positiva a la altura del PPT central dando un trecho corto de ADN de triple cadena (Nermut et al. 2003). El proceso de Transcripción reversa se detalla en la figura 11.

Ambas actividades, polimerasa y ARNasa H son requeridas para la conversión del ARN viral en ADN de doble cadena. La remoción de los cebadores de ARN define el final del ADN viral, estos finales específicos, las secuencias LTR, son los sustratos para la integración del ADN viral en el genoma de la célula hospedera, lo cual es llevado a cabo por la enzima viralmente codificada conocida como Integrasa (Julias et al 2003).

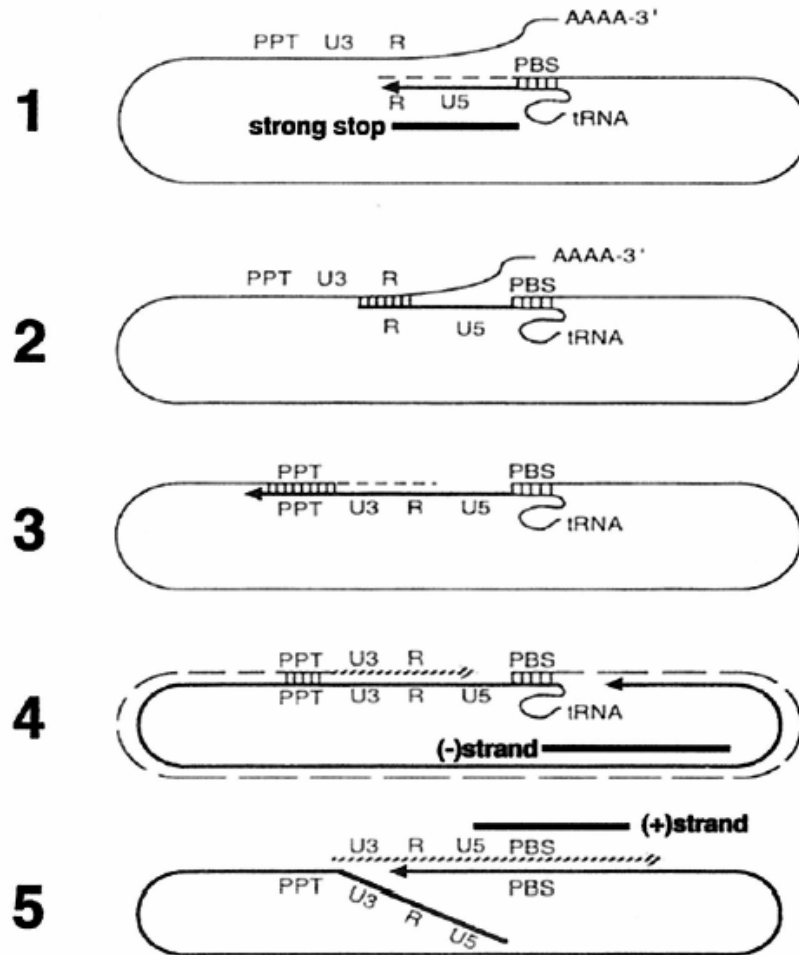


Figura 11. Representación esquemática de la Transcripción Reversa. (1) Se muestra la síntesis de la cadena de ADN de parada fuerte negativo que inicia en el sitio de unión al cebador (Primer binding site: PBS) donde se encuentra un tARN parcialmente desplegado. La RNAasaH degrada el ARN molde de polaridad positiva de forma que la primera transferencia de cadena puede tomar lugar. (2) Se forma un puente entre las dos secuencias R complementarias y la TR puede saltar a cualquiera de las cadenas de ARN para elongar la cadena negativa de ADN. (3) El ARN molde es degradado con excepción del PPT. (4) La síntesis del ADN negativo es completado. (5) La síntesis del ADN de parada fuerte positivo inicia en el PPT. El tARN cebador es removido y las dos cadenas de parada fuerte se aparean formando una molécula circular susceptible de ser elongada en la cadena positiva. Al final del proceso de elongación el intermediario circular es abierto en una molécula de ADN de doble cadena. Tomado de Nermut et al 2003.

Variabilidad Genética del VIH

Debido a la alta variabilidad de su genoma, el VIH ha dado origen a diferentes grupos genéticos, el VIH-1 y VIH-2 (Yabar C. 2003). Dos factores predisponen al VIH a ser genéticamente muy diverso, un mecanismo que contribuye a la variación genética es su alta tasa de mutación debido a su ADN Polimerasa dependiente de ARN que tiende a cometer errores, en parte debido a su falta de actividad de Lectura de Prueba y que genera rápidamente las variables resistentes a medicamentos conocidas como cuasiespecies (Hironori et al 2000), que son poblaciones altamente relacionadas a nivel genético dentro del mismo individuo (Yabar C. 2003), el otro

factor es la alta tasa de recombinación del genoma entre los virus del mismo individuo (Jetzt A. et al 2000).

La diversidad genética del VIH está bien evidenciada por el gran número de cepas de VIH aisladas alrededor del mundo las cuales han sido divididas en tres grupos (Jetzt et al 2000). Así por ejemplo, el VIH-1 está dividido en tres grupos genéticos: El grupo M (del inglés Main o principal), el O (del inglés Outlier) y el recientemente descubierto N (de New o nuevo). De todos ellos M es el más común y a excepción de los demás se divide en diez subtipos de la A – H, J y K. El VIH-2 por su parte sólo se divide en subtipos designados por letras desde la A hasta la F. (Yabar C. 2003). Adicionalmente, los virus originalmente conocidos como subtipo E (el grupo predominante involucrado en la transmisión heterosexual en Tailandia) y subtipo I (un pequeño grupo de virus de la región mediterránea) son ahora considerados como intersubtipos recombinantes y han sido llamados CRF01_AE y CRF04_cpx respectivamente. Muchas formas de virus se han diseminado epidémicamente para establecer distintos linajes. A estos se refieren como Formas Recombinantes Circulantes (CRFs), nueve de los cuales han sido ya identificadas. Los CRFs tienen una designación que incluye las letras de los subtipos genéticos padres, CRF01_AE por ejemplo, aunque los CRFs derivados de mas de tres subtipos las letras se reemplazan por _cpx (complejo) como es el caso de CRF04_cpx (Jetzt A. et al 2000).

En América Latina el Subtipo predominante es el B, seguido de los subtipos F, C y A, así como los recombinantes BF y CRF01_AE, CRF17_BF y CRF02_AG (Laguna et al 2005). La figura 12 presenta el porcentaje correspondiente a cada subtipo en 9 países latinoamericanos.

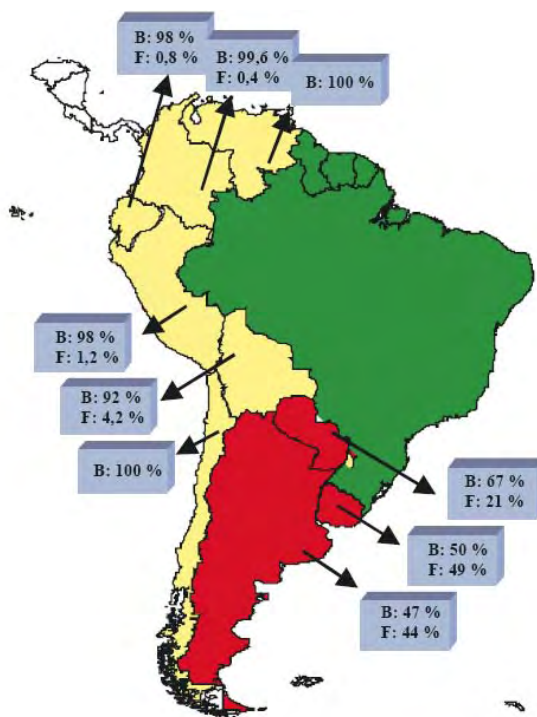


Figura 12 .Distribución de los subtipos de VIH en 9 países de Sudamérica, 1995 – 2002. Tomado de Laguna et al 2005.

Mutaciones en la Transcriptasa reversa

El VIH es capaz de desarrollar resistencia hacia todos los agentes antiretrovirales comúnmente utilizados (Kristiansen et al 2005). Dicha resistencia se origina por mutaciones en genes que codifican las enzimas diana de estos fármacos o en otras regiones del genoma relacionadas con la acción de estas enzimas. Las mutaciones relacionadas a resistencia pueden ser clasificadas como primarias o secundarias. Las mutaciones primarias aparecen generalmente antes y son relativamente específicas a cada antiretroviral y hacen decrecer la sensibilidad del virus a la medicación. Las mutaciones secundarias conocidas también como compensatorias, usualmente se acumulan en los genomas virales que ya tienen alguna mutación primaria, éstas mutaciones, no confieren reducción de la susceptibilidad del virus a los antiretrovirales sino que restauran las capacidades replicativas que el virus pudo ver comprometidas por sus mutaciones primarias incrementando de ésta manera la resistencia del virus, así por ejemplo, las mutaciones A62V, V75L, F77L y F116Y incrementan las capacidades replicativas de los virus que poseen la mutación primaria Q151M (García Lerma et al 2001). La **TABLA 4** Muestra una lista de mutaciones primarias y secundarias asociadas a resistencia a inhibidores de la TR.

TABLA 4.: Mutaciones asociadas con resistencia a Inhibidores de la TR de VIH-1.

Inhibidor de la TR	Mutaciones Primarias	Mutaciones Secundarias
Inhibidor Nucleósido de la Transcriptasa Reversa		
Zidovudina	K70R, T215Y/F	M41L, 67N,L210W,K219Q
Didanosina	L74V	K65R,M184V/I
Zalcitabina	K65R,T69D,L74V,M184V/I	
Lamivudina	E44D,V 118 I, M184V	
Stavudina	V75T	
Abacavir	K65R,L74V,M184V	M41L,D67N,K70R,Y115F,L210W,K219Q
Multinucleósido resistencia (a)	Q151M	A62V,V75I,F77L,F116Y
Multinucleósido resistencia (b)	T69S-SA/G/S	M41L,A62V,D67N,K70R,L210W,T215Y,K219Q
Inhibidor No Nucleósido de la Transcriptasa Reversa		
Neviparine	K103N, V106A,V108I, Y181C,Y188C,G190	L100 I
Delavirdine	K103N,Y181C	P236L
Efavirenz	K103N,Y188L,G190A	L100I,V108 I, P255H

Adaptado de García Lerma et al 2001

En muchos casos, las mutaciones corresponden a residuos próximos al sitio de unión de nucleótidos (es el caso de resistencia a inhibidores de la Transcriptasa Reversa análogos de nucleótidos: NRTI). El conocimiento de la estructura terciaria ha permitido conocer el efecto de tales mutaciones en la actividad de la TR de VIH-1; así pues, las variantes Tyr 115 Phe y Phe 116 Tyr , ambas del sitio de unión de dNTP (desoxinucleótidos trifosfato), tienen una actividad DNA polimerasa dependiente de RNA (RDDP) ligeramente más alta que la del tipo silvestre, mientras que la actividad de la variante que porta la sustitución Tyr 115 Val es aproximadamente del 75 % de la que la TR silvestre exhibe (Boyer et al 2000). Otras mutaciones pueden incluso afectar la actividad RNasa H de la TR de VIH-1, tal es el caso de la mutación H361A, H361 contacta el esqueleto de fosfato del ácido nucleico en la misma posición (tal y como lo hace) el aminoácido Y501 en el cebador RNasa H de agarre. Las mutaciones en Y501 han demostrado decrecer el título viral y afectar la especificidad del clivaje de la RNasa H (Julias et al 2003). En el caso de inhibidores no nucleosídicos de la Transcriptasa Reversa (NNRTI), los cambios de aminoácidos se localizan en un bolsillo hidrofóbico próximo al centro activo de la enzima, en residuos que alteran la unión de estos fármacos (Delgado B.E. 2003).

No obstante, a pesar de haberse demostrado que las mutaciones son una consecuencia de la presión selectiva que los antiretrovirales ejercen sobre el virus, algunos estudios con pacientes *naives* (vírgenes al tratamiento) demuestran que existen, desde antes del tratamiento, cepas con mutaciones de resistencia formando parte de la población vírica, cabe resaltar el hallazgo de las mutaciones M184V y K103 T conocidas por conferir resistencia a Lamivudina y Delavirdina respectivamente (Alexander et al 2001).

Adicionalmente, estudios en pacientes sin tratamiento previo han reportado la existencia de subpoblaciones de mutantes de VIH multidrogoresistentes (Gln151 Met, Phe 77 Leu y Phe 116 Tyr), el mismo estudio asocia la aparición de subpoblaciones resistentes a Zidovudina (Met 41 Leu, Asp 67 Asn, Lys 70 Arg, Leu 210 Trp, Thr 215 Tyr/Phe) en pacientes que iniciaron terapia combinada de Estavudina y Didanosina tras 24 a 48 semanas (Pellegrin et al 1999).

Hasta el momento se conocen 18 posiciones en el gen de la TR asociadas a resistencia a NRTI: 41, 44, 62, 65, 67, 69,70, 74, 75, 77, 115, 116, 118,151, 184, 210, 215 y 219. Las mutaciones de resistencia para NNRTI se conocen en 15 posiciones: 98, 100, 101, 103, 106, 108, 179, 181, 188, 190, 225, 227, 230, 236 y 238 (Rhee et al 2004).

Métodos de laboratorio para la determinación de resistencias

El desarrollo de resistencia a los antiretrovirales depende de muchos factores: la propia característica que tiene el VIH para introducir mutaciones en sus réplicas, la tasa de replicación viral, la respuesta inmunológica del hospedero, la carga viral, la presión selectiva ejercida por los medicamentos antiretrovirales específicos, dosis y farmacocinética de los antiretrovirales (especialmente la penetración de los medicamentos en compartimentos específicos del cuerpo de los pacientes) y la adherencia al tratamiento del paciente al régimen terapéutico establecido (Rachlis et al 1998).

Los ensayos de resistencias utilizan diferentes tecnologías que aportan información complementaria acerca de la sensibilidad a los antiretrovirales. Los dos métodos disponibles estudian el genotipo y el fenotipo (Arrizabalaga et al 2002). Brevemente, los métodos genotípicos tienen como base el análisis del genoma y por tanto encuentran la presencia de mutaciones. Las pruebas fenotípicas consisten en sistemas de replicación *in vitro* que enfrentan al virus con diferentes concentraciones de fármacos antiretrovirales. El grado de inhibición del crecimiento se establece por comparación con una cepa de referencia (García Vallejo et al 2003). Este trabajo en específico desarrolla el método genotípico.

Métodos Genotípicos

Una de las formas de detectar mutaciones de resistencia es la genotipificación del virus mediante los llamados “métodos genotípicos de determinación de resistencia”, los cuales se basan en el análisis de secuencias específicas del genoma del VIH con el fin de comprobar si existen mutaciones asociadas a la resistencia a antiretrovirales (Delgado B.E. 2003). Los ensayos genotípicos son usados para guiar al clínico en las decisiones concernientes al tratamiento de los pacientes. Hoy en día, las nuevas metodologías en genotipificación pretenden incluir cebadores que identifiquen virus diferentes al subtipo B ya que se ha observado que los subtipos no B están incrementando su incidencia (Snoeck et al 2005), es así que en Latinoamérica ya ha sido reportada la presencia de los subtipos A y C y otros recombinantes (Laguna Torres et al 2005).

A más de su aporte en el tratamiento de las personas que viven con VIH-sida (PVVS), las pruebas genotípicas son también de utilidad en otros campos de la investigación científica. En el año 2000, Hironori sugirió que la TR de los subtipos E y B evolucionaron convergentemente en los niveles fenotípicos y aminoacídicos cuando los inhibidores de la TR actúan como fuerzas

selectivas, encontrando las sustituciones aminoacídicas comunes a ambos subtipos D67N, K70R, T215F y K219Q de alta resistencia a AZT (Hironori et al 2000).

En función del principio en el que la prueba se base, el número de mutaciones detectables es distinto. Las técnicas que utilizan la secuenciación detectan todas las mutaciones presentes en las regiones del genoma del VIH que codifican para la TR y la proteasa. Si el fundamento de la técnica es la hibridación sólo se encuentra determinado número de mutaciones de significación conocida. Para secuenciar el VIH se pueden adoptar dos estrategias, el secuenciamiento del genoma proviral integrado en los linfocitos, que ya está como ADN, o la retrotranscripción previa de ARN viral plasmático, para obtener una colección de cADN retrovirales. Con el fin de garantizar secuencias en buena cantidad y pureza se procede luego a un PCR anidado, cuyos productos son luego purificados para eliminar restos de cebadores, sales, enzimas, nucleótidos, etc. Una vez purificado se procede a secuenciar y comparar las secuencias obtenidas con cepas de VIH no resistentes empleando un programa informático generalmente acoplado al secuenciador (García Vallejo et al 2003).

Las técnicas básicas y más comúnmente empleadas en genotipificación de resistencias en VIH son:

1.- **Secuenciación:** es el método de referencia. Obtiene una información completa acerca de las secuencias de ADN de la región del genoma amplificada previamente por PCR, a partir de ella se deduce la secuencia de aminoácidos, la cual se compara con la de una cepa de referencia del VIH (también llamada consenso). El último paso es la interpretación de resultados desde el punto de vista de su relevancia clínica y como elemento de toma de decisiones terapéuticas en el paciente en fracaso (Arrizabalaga et al 2002).

2.- **Detección de mutaciones puntuales:** basado en la hibridación mediante sondas específicas (LiPA), identifica mutaciones selectivas ya predeterminadas. Esta prueba se basa en la hibridización reversa de secuencias de VIH-1 etiquetadas con biotina amplificadas del plasma con cortos e inmovilizados oligonucleótidos. El híbrido es detectado con procedimiento colorimétrico basado en una Estreptavidina alcalina fosfatasa. Los ensayos detectan el genotipo silvestre y resistente y tienen alta sensibilidad detectando bajas proporciones de virus resistentes (~10%) (García Lerma et al 2001). Aquellas mutaciones que la prueba no incluye no podrán ser observadas ni ser descartada su presencia (Arrizabalaga et al 2002). En la figura 13 puede apreciarse la habilidad de la prueba para identificar al 10 % de todos los virus como resistentes por la mutación M184V de resistencia a Lamivudina (3TC).

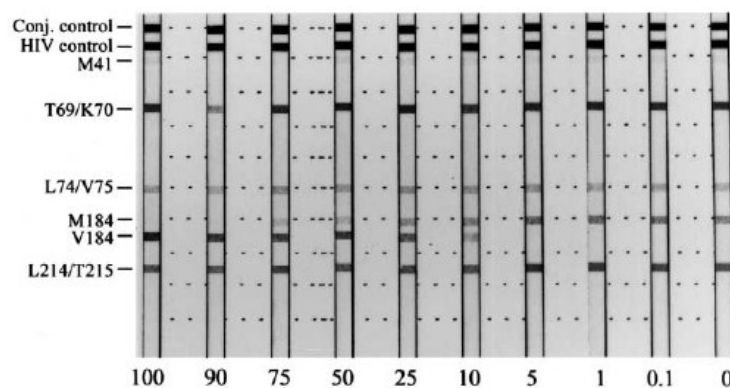


Figura 13. Detección genotípica de la mutación M184V mediante el ensayo HIV-1 LIPA. Los números bajo cada columna representan diluciones. El ensayo identifica hasta el 10% de la población como portador de M184V. Tomado de García Lerma et al 2001.

Genotipificación y determinación de resistencias

Mediante las diferentes pruebas de resistencia genotípica se han revelado algunas de las mutaciones puntuales más comúnmente relacionadas a antiretrovirales. En cuanto a inhibidores de la transcriptasa reversa concierne, se conocen las mutaciones M41L, D67N, K70R, L210W, T215 Y/F, K219Q/E que producen resistencia a todos los análogos de nucleótidos comercializados hasta la fecha, salvo la 3TC. Las mutaciones K103 N y Y188L reducen la utilidad clínica de los inhibidores de la TR no nucleósidos y la asociación de dos o más de las siguientes mutaciones L100I, V106A, Y181C/I, G190S/A y M230L, invalidan todos los inhibidores no nucleósidos de la TR actualmente comercializados (Arrizabalaga et al 2002).

Respecto al empleo de métodos de genotipificación, diversos estudios corroboran el beneficio en la evolución de pacientes en los que los cambios de tratamiento han sido condicionados por el patrón de resistencias, pero la interpretación de resistencias puede ser bastante compleja (Delgado B.E.2003). En torno a este punto, existen estudios retrospectivos realizados a lo largo de los años y que han demostrado la correlación entre la presencia de mutaciones y el fracaso terapéutico (García Vallejo et al 2003). En un estudio denominado HAVANA se realizó la comparación de cuatro metodologías para evaluar el valor de la genotipificación en el tratamiento en un grupo de 326 pacientes, de los que más del 75 % presentaba dos o más fracasos terapéuticos: a) genotipo con consejo de expertos, b) genotipo sin consejo de expertos, c) cuidado habitual con consejo de expertos y d) cuidado habitual sin consejo de expertos. A los 12 meses, el grupo que fue genotipificado obtuvo una reducción significativa de la carga viral respecto al grupo que recibió cuidado habitual (57% frente a 42 %, de reducción a menos de 400 copias/ml). Como conclusión del grupo de estudio HAVANA, se reportó que la genotipificación del VIH-1 en combinación con la información clínica es importante porque

mejora el pronóstico de vida del paciente, permite una toma de decisiones más adecuada en el cambio o mantenimiento de la TARV y mejora por tanto la calidad de vida del paciente (Tural et al 2002). En la **TABLA 5** Se muestran otros ensayos aleatorizados controlados que han demostrado el impacto a corto plazo de la detección de resistencia a los antiretrovirales.

TABLA 5: Ensayos Aleatorios controlados que avalan la detección de resistencias del VIH-1 a los antiretrovirales.

Estudio	Diseño
ADAM	Genotipo vs. recomendaciones empíricas generales
VIRADAPT	Genotipo vs. recomendaciones empíricas generales
GART	Genotipo vs. Interpretación experta vs. recomendaciones empíricas generales
VIRA 3001	Genotipo vs. recomendaciones empíricas generales
Kaiser	Genotipo vs. recomendaciones empíricas generales
NARVAL	Genotipo vs. recomendaciones empíricas generales
HAVANA	Genotipo vs. recomendaciones empíricas generales

Tomado de García Vallejo et al 2003.

Hasta hace poco, los datos disponibles sobre genotipificación de VIH-1 con pacientes latinoamericanos (entre ellos también peruanos) se correspondían a la subtipificación del virus más no a identificación a nivel molecular de las mutaciones de resistencia en genes específicos de la TR o de la proteasa (Laguna Torres et al 2005). No obstante, la asociación Civil IMPACTA ha reportado el uso de genotipificación en sujetos peruanos en el marco de un modelo nuevo de vigilancia de tercera generación (Lama et al. 2006).

Métodos fenotípicos

Los test fenotípicos definen la concentración de fármaco que inhibe el crecimiento en cultivo de una determinada cepa viral, dando una medida directa de la sensibilidad frente a los diferentes antiretrovirales (Arrizabalaga et al 2002). Básicamente éstas técnicas consistían en el cocultivo de linfocitos del paciente con líneas celulares linfoides, como MT2 y MT4, en presencia de fármacos antiretrovirales. Después de unas semanas se medía la replicación viral por la producción del antígeno p24 o la actividad de la TR. Estas técnicas son muy laboriosas en comparación a las basadas en genotipificación, además son costosas y requieren una adecuada infraestructura así como de un largo tiempo de ejecución. No obstante, estos obstáculos se han resuelto mediante las técnicas de virus recombinantes. Estas determinan la concentración que inhiben 50% de la infectividad (IC_{50}) y la compara con la IC_{50} de una cepa de referencia o de un aislamiento anterior de un mismo paciente (García Vallejo et al 2003). Una de las principales ventajas que presentan las pruebas fenotípicas de resistencia a los fármacos antiretrovirales es su

capacidad para medir directamente la sensibilidad al fármaco en cuestión informando incluso sobre resistencias cruzadas aplicables a cualquier molécula.

Pruebas fenotípicas basadas en replicación

Estas pruebas requieren el uso de aislamientos clínicos de VIH-1, desde cultivos de plasma o de sangre periférica. La variedad existente de kits comerciales se basan en el modelo original propuesto por Kellam y Larder en 1994. Este ensayo emplea secuencias de TR amplificadas por PCR provenientes de pacientes y clones provirales de laboratorio carentes del gen de la TR con los que se genera virus recombinantes en una cepa de células T humanas. Los recombinantes retienen la susceptibilidad a las drogas que el espécimen clínico aporta y se cultivan *in Vitro* para probar su susceptibilidad a diferentes antiretrovirales. La figura 14 representa éste proceso.

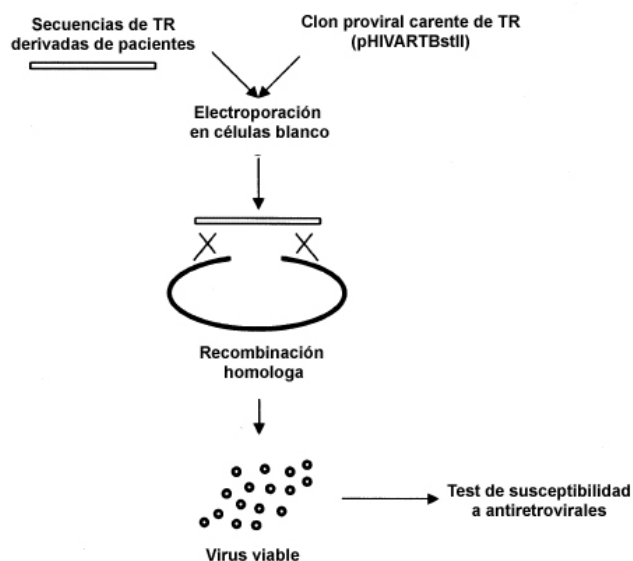


Figura 14. Representación esquemática de la primera prueba con virus recombinantes (Recombinant Virus Assay:RVA) desarrollada por Kellam y Larder en 1994. Los valores IC₅₀ e IC₉₀ se determinaron usando una línea de células T humanas. Adaptado de García Lerma et al 2001.

Entre las marcas disponibles de este tipo de prueba se encuentran: ViroLogic Phenosense y el Virco Antivirogram Assay. El primero de ellos basa su análisis en la actividad de una Luciferasa contenida en el provirus carente de TR y Proteasa como medida del nivel de resistencia, en presencia de inhibidores de la Proteasa y la TR. Ya que el recombinante es defectuoso en su replicación, la actividad de la Luciferasa es medida después de un único evento de replicación. En el caso del Virco Antivirogram, la replicación es analizada usando un gen reportero en un ensayo celular (García Lerma et al 2001).

Pruebas enzimáticas para determinación fenotípica de la TR

Básicamente estas pruebas miden la capacidad de la TR proveniente de pacientes para hacer cADN a partir de un ARN conocido mediante un ensayo de PCR, en presencia de los

antiretrovirales a los que se desee medir la susceptibilidad. Entre los diferentes ensayos pueden varias algunas condiciones así como el ARN sobre el que la TR trabajará. Un ejemplo de éste tipo de ensayos lo constituye Amp RT propuesto por García Lerma et al. En este ensayo el ARN a emplear como molde proviene del genoma del Virus de la Encefalomiocarditis (ECMV). EL cADN es detectado mediante PCR y una hibridización basada en ELISA. Ya que no se requiere de cultivos y aislamientos virales la información se provee en forma mas rápida (1 a 2 días) (García Lerma et al 2001).

A manera de resumen, la **TABLA 6** presenta algunas pruebas comerciales, genotípicas y fenotípicas para la determinación de resistencias en VIH-1.

TABLA 6: Pruebas comerciales para la determinación de resistencias del VIH-1 a medicamentos antiretrovirales

Metodología	Denominación	Compañía	Aplicación
Secuenciación	HIV Genotyping system kit	PE Biosystem	Genotipificación
	TruGene HIV Resistance Kit	Visible Genetics	Genotipificación
	ViroGen	Virco	Genotipificación
	Geneseq HIV	ViroLogic Inc.	Genotipificación
Hibridación	Imno-Lipa HIV nucleosides	Versant/Bayer	Genotipificación
	Imno-Lipa HIV protease	Versant/Bayer	Genotipificación
	Imno-Lipa HIV non-nucleosides	Versant/Bayer	Genotipificación
	Imno-Lipa HIV MultiDrug Resistance	Versant/Bayer	Genotipificación
	HIV PRT-440("GeneChip")	Affimetrix	Genotipificación
Virus Recombinante	Antivirogram	Virco	Fenotipificación
	Phenosense	Virologic Inc	Fenotipificación

Tomado de García Vallejos et al 2003

Algunas ventajas y desventajas consideradas en el uso de métodos genotípicos y fenotípicos de detección de resistencias se detallan en la **TABLA 7**.

TABLA 7: Ventajas y desventajas de los ensayos fenotípicos y genotípicos

Ensayo	Ventajas	Desventajas
Ensayos Fenotípicos		
Ensayos basados en Replicación	Medida directa de la susceptibilidad a drogas.	Expensivos y laboriosos
	Puede valorar patrones complejos de resistencia	Los resultados tardan mucho tiempo (2,4 semanas)
	Los resultados son mas familiares para los clínicos	Valores de corte clínicamente relevantes, valores no definidos con claridad
Ensayos enzimáticos	Rápidos (1 a 2 días), simple y barato	Ensayos rápidos de proteasa no desarrollados.
	Puede detectar baja proporción de virus resistentes	Por lo común no pueden detectar resistencia a AZT
Ensayos genotípicos	Mas baratos y mas rapidos que los ensayos basados en replicación	Medida Indirecta de la susceptibilidad
	Menos técnicamente demandantes que los ensayos basados en replicación	Requiere la interpretación clínica de expertos
		Patrones de resistencia no claramente definidos

Adaptado de García Lerma et al 2001.

V.- MATERIAL Y METODOS

V.1.- Material Biológico:

Población de estudio

Se contó con las muestras de hombres y mujeres mayores de 18 años diagnosticados VIH positivos por el Programa Militar de Enfermedades de Transmisión sexual y SIDA (PROMETSS) del Hospital Militar Central (antes Comité de Prevención y Control de SIDA (COPRECOS)) y que contaran con tratamiento antiretroviral previo así como tendencia estable del numero de copias de carga viral superior a 400 copias /ml. Esta cifra fue considerada debido a que es la cantidad mínima detectable por el Kit Amplicor empleado por el Laboratorio de VIH del Instituto Nacional de Salud (INS). Se seleccionaron 11 muestras cuyas características, incluyendo tiempo en tratamiento y esquema de tratamiento antiretroviral al momento de la toma de muestra se indican en la **TABLA 8**.

Todos los participantes aceptaron participar en el estudio firmando un consentimiento informado cuyo formato fue aprobado por el comité de Etica del INS.

TABLA 8: Características de tratamiento ARV, recuento celular y carga viral de la población de estudio.

CODIGO COPRECOS	CARGA VIRAL	CONTEO CD4/CD8 cel/ul	TIEMPO EN TRATAMIENTO	TRATAMIENTO
CO2	20638	128	2 años	Conbivir+Nelfinavir
CO5	4232	181	6 años	Conbivir+Nelfinavir
CO7	70949	146	2 años	Conbivir+Efavirenz
CO9	7041	134	1 año	Conbivir+Efavirenz
CO14	16050	152	2 meses	Kaletra+Efavirenz
CO15	189251	21	4 meses	Kaletra+Efavirenz
CO18	9368	336	4 años	Zidovudina+Lamivudina+Nelfinavir
CO19	110118	154	2 años	Zidovudina+Lamivudina+Efavirenz
CO21	750000	40	2 meses	Kaletra+ Zidovudina+ Lamivudina
CO22	11543	181	6 meses	1.-Nelfinavir+Zidovudina+Lamivudina 2.-Abacabir+Stavudina+Didanosina Actual: Efavirenz+Didanosina+Zidovudina
CO25	381246	34	3 meses	Zidovudina+Lamivudina+Kaletra

Sangre de sujetos infectados

Sangre Total no coagulada (2 ml) de donde se tomaron 200 μ l para purificar ADN a partir de linfocitos mediante el Kit de extracción de ADN: QUIAM BLOOD (Qiagen 2005). La sangre no procesada fue llevada a congelación en tanto que el DNA purificado fue conservado a -20°C .

V.2.-Material de Laboratorio:

V.2.1.- Equipos:

- ✓ Microcentrífuga Eppendorf modelo 5417C
- ✓ Baño María Modelo 1166 (VWR Scientific)
- ✓ Bomba de Vacío.
- ✓ Spectronic 21 D –Milton Roy
- ✓ Cámaras BIO RAD de electroforesis.
- ✓ Transiluminador modelo
- ✓ Secuenciador Alfa Express para secuenciamiento automático de ADN modelo
- ✓ Termociclador modelo 9700 de Applied Biosystem.
- ✓ Computadora con Software de Análisis de Secuenciamiento: con acceso a la Web para el análisis On Line de las secuencias obtenidas.

V.2.2.- Reactivos:

Todos los reactivos que fueron utilizados en la presente tesis tuvieron grado biología molecular de pureza.

✓ Procesos de extracción y purificación de ADN:

- Kit de extracción de ADN: QUIAM BLOOD (Qiagen).
- KIT para la purificación de productos de PCR: ADN PCR: WIZARD PCR.PREP (PROMEGA)

✓ **Reactivos de electroforésis:**

- Agarosa (Gibco),
- TAE 50

✓ **Reactivos e insumos para amplificación de ADN de VIH-1**

- Buffer 10X EPPENDORF para PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3 (a 25°C). Sin Magnesio. Para una concentración final 1X en tubo de 20ul.
- Mix de Desoxinucleótidos Trifosfato (dNTP mix) (EPPENDORF) para una concentración final de 0.2 mM.
- Cloruro de Magnesio 25mM (EPPENDORF): concentración final 3 mM en el primer ciclo de amplificación y 2 mM en el segundo.
- Enzima Ampli Taq ADN polimerasa 5 U/ul (Eppendorf) concentración final 0.025 U/ ul.
- Primers específicos para la TR :

A (5'-TTGGTTGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATT-3')

B (5'- GGATGGAAAGGATCACCG-3')

NE1 (5'-CTTACTAACTTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGT-3')

Willson et al 2000.

✓ **Reactivos para Secuenciamiento de Productos de Amplificación.**

KIT Para secuenciamiento "Termo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit" (Amersham Pharmacia)

V.3.-Métodos

V.3.1.- Colección y Selección de Muestras

Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos de vidrio sellados al vacío con anticoagulante EDTA provenientes de COPRECOS de acuerdo a las coordinaciones realizadas por el Instituto Nacional de Salud.

Para el presente trabajo fueron considerados los siguientes criterios de inclusión:

- ✓ Pacientes de ambos sexos y mayores de 18 años con tratamiento previo.
- ✓ Pacientes con TARV que muestran carga viral con tendencia estable y superior a 400 copias/ml. Esta cifra representa el límite mínimo de copias que el Kit Amplicor HIV-1, detecta (ROCHE: AMPLICOR HIV-1 Monitor Test. Versión 1.5.)
- ✓ Muestras que sean identificadas como HIV subtipo B.

V.3.2.- Subtipificación.

La identificación del Subtipo B de VIH-1 se realizó mediante el ensayo de Movilidad de Heterodúplex (HMA) por el Blgo. Carlos Augusto Yabar Varas (datos no mostrados).

V.3.3.- Extracción de ADN

La extracción del material genético fue hecha mediante el empleo del Kit de extracción de ADN Qiamp Blood (Qiagen) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante y efectuando algunas modificaciones a partir de un volumen de 200 ul de sangre extraída. El kit de extracción incluye: Proteasa QIAGEN, Buffers AL, AW1, AW2 y columnas Quiamp entre otros componentes no empleados en la presente metodología de extracción.

El proceso fue realizado de la siguiente manera, un volumen de 200 ul de sangre fue mezclada con 20 ul de Proteasa y buffer AL de lisis mediante Vórtex por 15 segundos e incubados por 10 minutos a 56 ° C en baño maría modelo 1166 (VWR Scientific). Después de una breve centrifugación a máxima velocidad se añadió un volumen de 500 ul de Etanol, para condensar el material genético y se mezcló nuevamente mediante vortex por 15 segundos y un centrifugado rápido. La muestra pasó entonces a una columna Quiamp, que fue puesta en un tubo eppendorf de 1.5 ml para ser centrifugada a 6000 g (8000 rpm) por espacio de un minuto. Finalizado este paso se descartó el tubo eppendorf que funcionó como tubo de colecta y se reemplazó por otro, previamente se añadió 500 ul de Buffer AW 1 para un primer lavado a 6000 g (8000rpm) por un minuto. Seguidamente

se efectuó un segundo lavado empleando el buffer AW2, esta vez el centrifugado fue a 20 000 g (14000 rpm) por 3 minutos.

Terminado el proceso de extracción, el material genético total (ADN y ARN juntos) fue suspendido en 100 ul de agua destilada, ello teniendo en consideración que tal volumen es sugerido para muestras que contienen 1–1.5 x 10⁷ cels/ml (Manual del Kit QIAGEN) y teniendo presente que las muestras de pacientes con VIH exhiben bajos conteos CD4/CD8 de acuerdo a sus respectivas fichas clínicas (**TABLA 9**). Las muestras de material genético conteniendo el ADN genómico y ARN total fueron conservadas en refrigeración. Una alícuota fue conservada a 4°C para su uso inmediato y otra a -20°C para su conservación a largo plazo. Es importante señalar que el material genético fue conservado en agua destilada de 18 megaohms de pureza y libre de nucleasas para facilitar su cuantificación por espectrofotometría.

V.3.4.- Cuantificación de Material Genético

Para conocer la concentración del material genético (ADN Y ARN juntos) extraído se empleó el equipo Spectronic 21 D –Milton Roy haciendo uso de la lámpara de luz Ultravioleta a 260 nm de longitud de onda. Para propósitos de cálculo se asumió que 1 OD (260 nm) = 50 ug/ml de material genético (Sambrook y col., 1989). Las muestras fueron diluídas 1/ 50 en agua destilada y NaCl 0.1M y el cálculo de la concentración final fue hecho tomando en cuenta la siguiente operación:

Concentración Final = [Concentración de material genético diluido] X [Factor de Dilución empleado]

V.3.5.- Cebadores

Se utilizaron tres sets de cebadores denominados: A, B y Ne1 (ver secuencias en la metodología) Willson et. al., 2000

La combinación de los cebadores A y Ne1 flanquean una región de 800 pb mientras que B y Ne1 delimitan una porción de aproximadamente 339 pb de acuerdo a la referencia de Willson et al 2000.

La posición referencial de los cebadores empleados fue visualizada usando un alineamiento virtual mediante el programa PrimeAlign disponible online en:

<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/PRIMALIGN/PRIME.html>

Los alineamientos pueden apreciarse en las figuras 15 a 18.

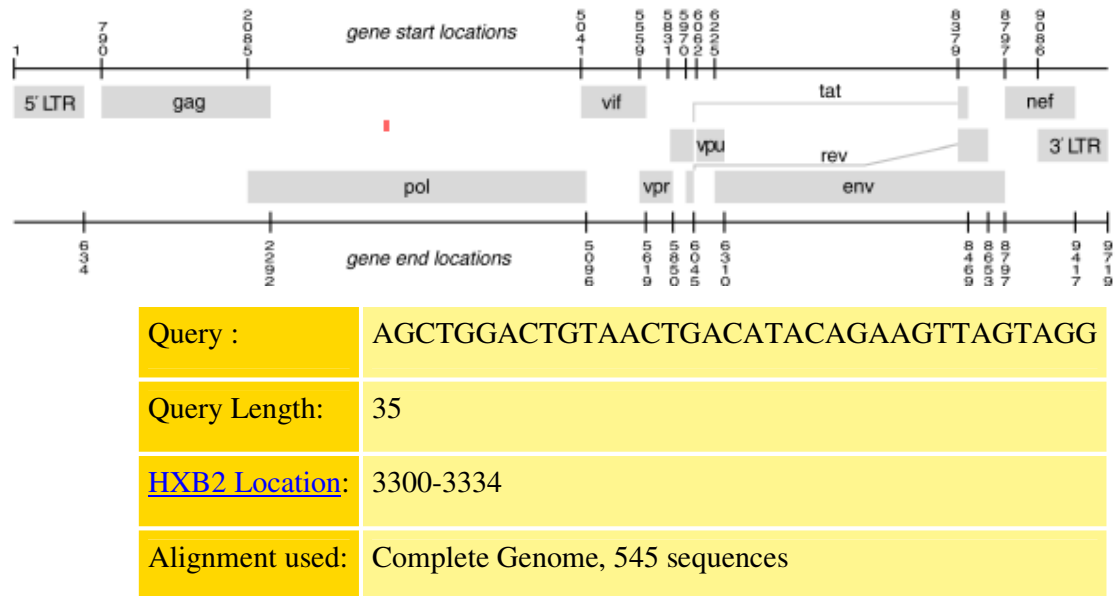


Figura15. Alineamiento virtual del Primer No1 en la secuencia genética del VIH

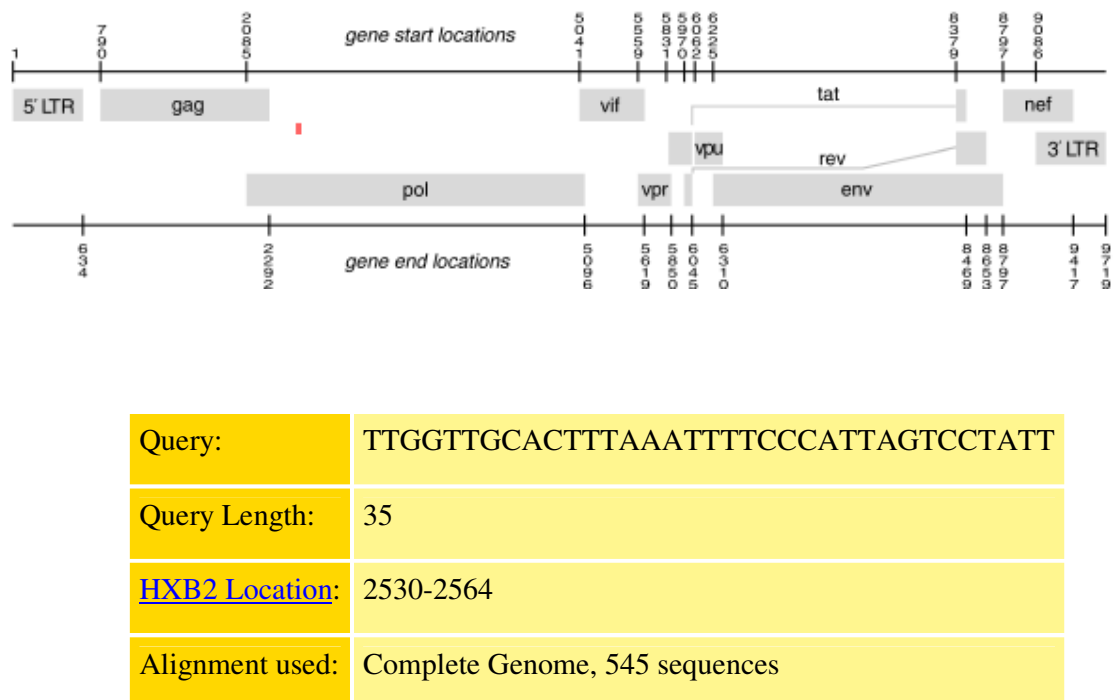
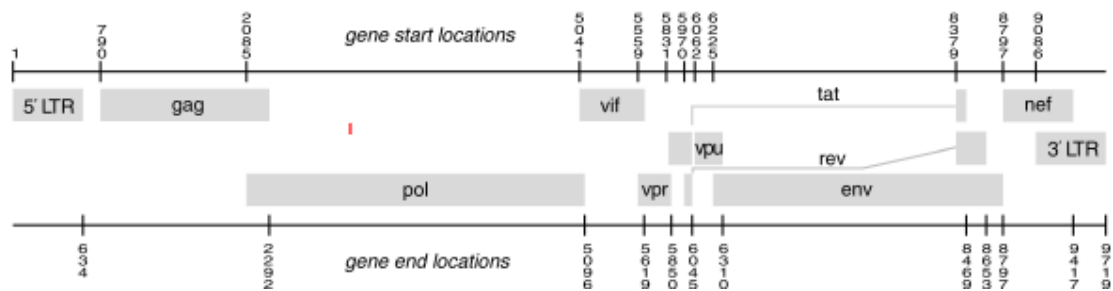


Figura16. Alineamiento virtual del cebador Pol A en la secuencia genética del VIH



Query:	GGATGGAAAGGATCACCG
Query Length:	18
HXB2 Location:	3003-3020
Alignment used:	Complete Genome, 545 sequences

Figura17. Alineamiento virtual del cebador B en la secuencia genética del VIH



Figura 18. Representación esquemática del área a amplificar y secuenciar B-Ne1 .

V.3.6.- Amplificación del gen de la Transcriptasa Reversa

1° Amplificación de PCR (Cebadores Pol A y Ne1)

Las condiciones de amplificación fueron seguidas de acuerdo a lo descrito por Willson et al. 2000 con algunas modificaciones. Se consideró la optimización de los diferentes parámetros químicos y físicos del PCR a fin de lograr la amplificación del producto bajo las condiciones de laboratorio y la calidad de los reactivos utilizados. Para ése fin, fue necesario evaluar las concentraciones de los diferentes componentes, así como las temperaturas de annealing (temperaturas de hibridación) de los primers en el sistema.

Concentración de Cebadores.

La concentración de la solución de trabajo fue de 250 ng/ul para una concentración final de 2.5 ng/ul en un volumen final de reacción de 20 ul (The Division of AIDS National Institute of Allergy & Infectious Diseases National Institute of Health and collaborative investigators .1997).

Programa de PCR y determinación de la Temperatura de Hibridación de cebadores.

Para iniciar, ambos Ciclos de Amplificación de PCR se hicieron con idénticas condiciones:

TABLA 9: Programa Inicial de PCR

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	95 °C	90 seg
	94 °C	30 seg
35 ciclos	55 °C	30seg
	72 °C	60 seg
1 ciclo	72 °C	10 min

Todo este esquema se repitió en 30 ciclos.

Del mismo modo se evaluó la temperatura de hibridación en tres diferentes temperaturas 58 °C, 60 °C y 65 ° C y se incrementó el tiempo de hibridación a 1 minuto en todos los casos. Dicho tiempo de 1 minuto quedó como una constante. Las temperaturas evaluadas se eligieron tomando como base las temperaturas de alineamiento de los cebadores Ne1, A y B: 60.3 °C, 58.9 °C y 52.8 °C respectivamente. Los datos de temperatura se obtuvieron empleando el software Oligo Analyzer 3.0 ejecutable online: <http://www.idtdna.com/SciTools/SciTools.aspx>

Finalmente el programa de PCR empleado para lograr el amplificado se expresa en la sección de resultados.

Concentración de Material Genético.

Se realizó una curva con las siguientes concentraciones: 10, 20, 40, 50 y 100 ng de material genético en 20 ul de volumen final de reacción, equivalentes a las concentraciones finales: 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 y 5 ng/ul respectivamente. La respectiva corrida electroforética puede apreciarse en la sección de resultados.

Algunos reactivos no fueron alterados en concentración y se mantuvieron de manera constante en todo el proceso tales como el buffer de reacción (1X), dNTP (0,2 mM) y la Enzima Ampli Taq ADN polimerasa (5 U/ul para 20 ul de volumen final). La concentración de magnesio si debió ser alterada para el segundo Ciclo de Amplificación de PCR.

2° Amplificación de PCR (Heminested PCR) (Cebadores B y Ne1)

Los productos del primer Ciclo de Amplificación de PCR fueron sometidos a un segundo PCR usando los cebadores B y Ne1. Para lograr la amplificación de la región de interés también se estandarizaron las concentraciones de magnesio, temperatura de hibridación de cebadores y alícuotas del producto de PCR proveniente del primer Ciclo de Amplificación para un volumen final de 20 ul. Excepto por el magnesio todos los reactivos de PCR mantuvieron la concentración determinada para el primer ciclo de amplificación.

Concentración de Cloruro de Magnesio.

La concentración de magnesio requerida para el sistema se estableció mediante una curva de diferentes concentraciones de Magnesio empleando la siguiente escala: Mg 0 mM (sin magnesio en la reacción) 2 mM, 3 mM, 4 mM y 5 mM. La visualización de la corrida puede apreciarse en la sección de resultados.

Ensayos con enzimas de restricción

A fin de comprobar que lo obtenido por PCR correspondía al producto esperado (amplificado de 339 – 332 pb), los amplificados fueron sometidos a restricción con diferentes ADNsas seleccionadas mediante el software online “Restriction enzyme digest of ADN with all commercially available restriction enzymes” en:

http://www.in-silico.com/s_restriction/

Las enzimas seleccionadas fueron: ALU I, PVU II, MboI y RSAI usando 1.9 ul, 2.4 ul ,1.9 ul y 1.9 ul para 10 ul de volumen total. Se emplearon los siguientes Buffers: 1 ul de Buffer B (10X) para ALU I y PVU II, 1 ul de Buffer C (10X) para RSA I y 1.5 ul de Buffer Universal (15X) para MboI en presencia de 0.1 ul de Sero Albúmina Bovina (BSA 100X 10 ug/ml). Cada enzima con su respectivo buffer según indicación del fabricante. La figura 19 representa los lugares de corte y segmentos esperados al trabajar con las enzimas de restricción elegidas, todo ello empleando como referencia la cepa HXB2.

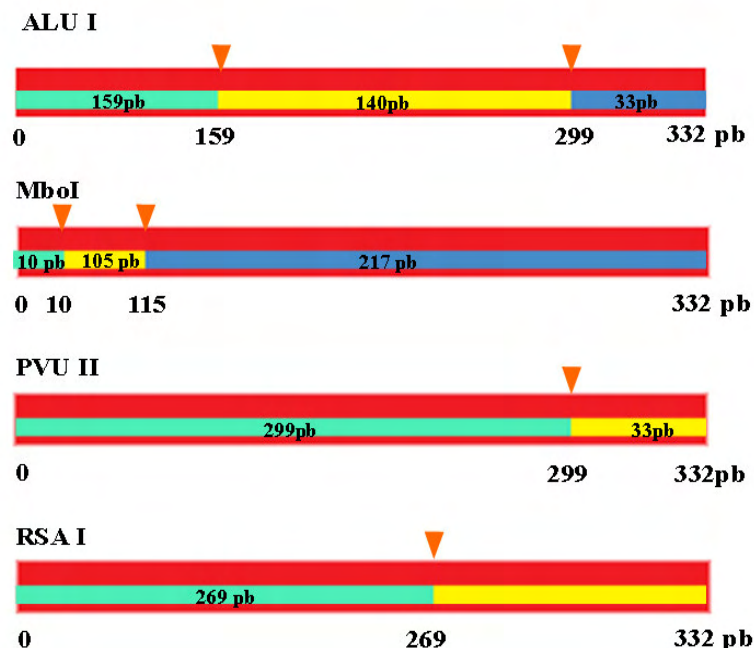


Figura 19. Segmentos esperados al cortar con las enzimas de restricción ALU I, MboI, PVU II y RSA I.

La corrida electroforética mostrando el resultado de la prueba de restricción se muestra en la sección de resultados.

Estandarización del PCR para la amplificación en volumen de 100ul

Para lograr la amplificación del mismo producto en un volumen final de 100 ul y así pasar al proceso de purificación, se estandarizó el volumen adecuado de producto del PCR proveniente del primer ciclo de amplificación a ser utilizado como ADN molde en el segundo ciclo de amplificación. La estandarización fue realizada con el fin de evitar falsos negativos debido a la inhibición de la amplificación por exceso de producto de PCR. Con tal propósito se probaron las siguientes diluciones del ADN PCR del primer Ciclo de Amplificación: 1/10, 1/50 y 1/100. Las diluciones se realizaron en la misma agua ultra pura empleada para las reacciones de PCR 1 y 2.

V.3.6.- Purificación de los Productos de Amplificación

La purificación se realizó empleando el kit ADN PCR: WIZARD PCR.PREP (PROMEGA).

Como paso previo al purificado, la totalidad de los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa Low Melting al 1.5 %. En nuestro caso 100 ul de ADN PCR. El gel fue coloreado con Bromuro de Etidio y visualizado en el transiluminador, se cortó la banda correspondiente y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml para ser puesto en baño maría a 70 °C. Ya licuado el gel se vertió 1 ml de resina de purificación y se mezcló por 20 segundos sin llevar a vortex. La mezcla Resina / ADN PCR fue puesta en la columna wizard aplicando el vacío hasta pasar el contenido total de la columna. Tras añadir Isopropanol al 100 % se reaplicó el vacío por un espacio de 1 a 2 minutos. Luego se separó la columna y se la colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml para ser centrifugada por primera vez a 14000 rpm por 20 segundos con el fin de remover el Isopropanol residual, luego se llevó la columna a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml añadiendo 50 ul de agua destilada dejando descansar por un minuto y se centrifugó una vez más a 14 000 rpm por 20 segundos para eluir el ADN de la columna.

Con el objetivo de recuperar todo el ADN PCR necesario para el siguiente paso de secuenciamiento se hizo un tercer y último centrifugado guardando los purificados a – 20 °C hasta el momento de su uso.

V.3.7.- Secuenciamiento

Los productos del ADN PCR se sometieron a secuenciamiento directo con nucleótidos marcados mediante electroforesis vertical en el secuenciador Alf Express que emplea el método de Sanger de detección de dideoxinucleótidos usando el “Termo Sequenase Cy5 Dye Terminador Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences)

El secuenciamiento se hizo en tres momentos:

- PCR con ddNTP.
- Limpieza de ddNTP remanentes
- Secuenciamiento propiamente dicho en el Secuenciador Alf Express.

PCR con ddNTP.

Para llevar a cabo el PCR con los ddNTPs se manejaron dos mezclas, las mezclas ddNTP (uno por cada base A, C, T, G) y mezcla maestra general. Se separaron cuatro tubos con las claves A mix, C mix, G mix y T mix y se hizo la mezcla de reactivos correspondiente según se describe en la **TABLA 10**:

TABLA 10: ddNTPS mezclas maestras

	Tubo A Mix	TuboC Mix	Tubo G Mix	Tubo T Mix
	(ul)	(ul)	(ul)	(ul)
1.1 mM dNTP	4	4	4	4
Cy5-ddNTP	2	2	2	2
Agua PCR	16	16	16	16
Volúmen Total (ul)	22	22	22	22

Cada uno de estos tubos representa un ddNTP mezcla maestra.

Una vez preparada la mezcla, esta fue llevada al vortex para luego pasar por centrifugado rápido a fin de concentrar todo el volumen en el fondo del tubo, posteriormente se les guardó en la oscuridad y a -20 °C hasta ser requerido.

En simultáneo se prepararon 40 tubos. Cada cuatro tubos correspondieron a una muestra diferente y a una de las cuatro bases nitrogenadas.

De las mezclas maestras ya preparadas se tomaron 2 ul para cada uno de los 40 tubos según sea A, C, G o T tapándose para evitar evaporación y cubriéndose de la luz a fin de evitar la reacción del didexonicleuótido marcado con el fluorescente Cy5.

En tubos de 1 ml se preparó la siguiente mezcla, uno por cada muestra a procesar:

TABLA 11: Mezcla maestra general.

	Volúmen en ul/tubo
Cebador B (2pm/ul) *	2
Buffer **	3.5
Enzima Thermo Sequenase (10 U/ul)	1
Agua PCR	16.5
ADN PCR purificado	2

* El kit señala 4 pmol totales en el volúmen final del mix master.

** Buffer de reacción provisto por el Kit.

Las nuevas mezclas fueron homogenizadas mediante vortex y centrifugadas tomándose luego 6 ul para cada uno de los 40 tubos de acuerdo a la muestra. Para terminar se procedió a un nuevo homogenizado en vortex y un centrifugado rápido pasando enseguida al termociclador. Cabe resaltar que todo este proceso se hizo en dos diferentes lugares, primero en la cámara de PCR hasta antes de poner las muestras problema de material genético purificado y posteriormente en la cámara de flujo laminar en el momento de añadir a las mezclas las muestras de material genético a ser secuenciadas. Las condiciones del programa de PCR se detallan a continuación:

TABLA 12: Condiciones del Programa de PCR con ddNTPs

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	95 °C	60 seg
30 ciclos	95 °C	30 seg
	60 °C	30 seg
	72 °C	80 seg
	4 °C	10 min

Todo éste esquema se repitió 30 ciclos. Una vez finalizados los ciclos, cada tubo fue pasado por un centrifugado rápido y colocado en hielo.

Remoción de ddNTP remanentes

A cada tubo se agregó 2 ul de acetato de amonio 7.5 M, 2 ul de solución de glicógeno y 30 ul de etanol al 100% helado. Dicha mezcla fue homogenizada y colocada a -20 °C toda la noche para precipitar el ADN.

Al día siguiente los tubos fueron centrifugados a alta velocidad (14000 rpm) por 30 minutos a temperatura ambiente, los sobrenadantes obtenidos se eliminaron y el precipitado centrifugado nuevamente por 5 minutos en 200 ul de etanol helado al 70 % de concentración. Una vez hecho esto se removió el sobrenadante lo que permitió que el alcohol restante se evapore al medio ambiente o bien se pusieron los tubos en estufa a 37 °C por 5 minutos. Una vez hecho esto, los precipitados se resuspendieron en 6 ul de formamida (provisita por el kit) homogenizados por 20 segundos y sometidos a un centrifugado rápido para colectar todo el volumen en el fondo del tubo. Es muy importante que los precipitados sean por completo resuspendidos en este paso.

Secuenciamiento propiamente dicho en Secuenciador Alf Express.

Antes de colocar las muestras en el gel, se realizó la denaturación de los productos amplificados mediante una incubación a 70 °C por 3 minutos y luego renaturados en hielo seco. Finalmente, el volumen total de cada tubo fue colocado en los pocillos del gel de secuenciamiento.

V.3.8.- Análisis de las Secuencias de ADN de VIH

V.3.8.1.- Conversión de las secuencias de Nucleótidos a Secuencias aminoacídicas.

Para este fin se empleó el software online “Translate Tool” en: <http://au.expasy.org/tools/ADN.html>.

Este software permite traducir secuencias de ADN a secuencias de aminoácidos ordenándolas de forma tal que se eliminen “codones STOP”. La configuración del mismo permite obtener las secuencias aminoacídicas alineadas con la secuencia de nucleótidos que sirvió como secuencia problema para el software.

V.3.8.2.- Comparación de Aminoácidos

Las secuencias fueron alineadas por apareamiento múltiple empleando el Software Clustal W disponible on line <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> para la determinación de divergencia de residuos de aminoácidos, deleciones e inserciones.

V.3.8.3.- Identificación de Mutaciones de Resistencia

Las mutaciones se identificaron mediante comparación de las secuencias obtenidas con secuencias existentes en los bancos de genes del software de análisis HIV db Program Versión 4.1.2 de Standford HIV RT and Protease Sequence Database ejecutable On Line <http://hivdb.stanford.edu/>

VI.- RESULTADOS

VI.1.- Las muestras de VIH presentaron diferentes concentraciones de Material Genético

Las muestras cuantificadas presentaron valores variables de material genético, ninguna alcanzó los 100 ng/ul, lo cual se esperaba en vista del bajo conteo celular reportado con anterioridad en la **Tabla 9**. La cantidad de material genético extraído varía entre 30ng/ul (CO14) y 85 ng/ul(CO7). Estos datos fueron un indicador definitivo, pues evidenciaron la necesidad de determinar una concentración estandarizada necesaria de material genético para el sistema de PCR, motivo por lo que se realizó una curva de material genético (ver mas adelante). Es resaltable el hecho de que, los conteos celulares más altos no se corresponden estrictamente a las concentraciones de material genético más altas (ver **Tabla 13**). Esto podría indicar posible pérdida de material genético durante el proceso de extracción, sin embargo, el material genético extraído fue suficiente para el proceso de estandarizado y consiguiente secuenciamiento.

TABLA 13: Cuantificación de Material Genético (ADN y ARN juntos) de la población estudiada.

Muestra	Abs(260nm)	[ADN y ARN]= ng/ul	Conteo CD4/CD8
CO2	0.015	37.5	128
CO5	0.021	52.5	181
CO7	0.034	85.0	146
CO9	0.017	42.5	134
CO14	0.012	30.0	152
CO15	0.023	57.5	21
CO18	0.023	57.5	336
CO19	0.027	67.5	154
CO21	0.016	40.0	40
CO22	0.014	35.0	181
CO25	0.018	45.0	34

VI.2.- La temperatura de alineamiento, la concentración de ADN y de Cloruro de Magnesio fueron factores importantes para la amplificación del gen de la transcriptasa reversa

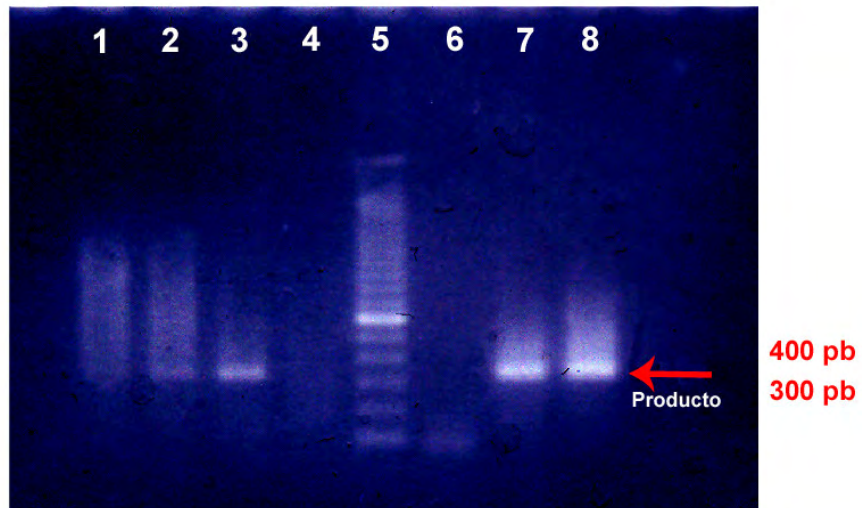
La temperatura de alineamiento establecida varía de la propuesta en la literatura. En nuestro caso, empleamos una temperatura de 60°C para ambos ciclos de amplificación como lo detalla la siguiente tabla:

TABLA 14: Programa Final de PCR

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	95 °C	90 seg
	94 ° C	30 seg
35 ciclos	60 °C	60 seg
	72 °C	60 seg
1 ciclo	72 °C	10 min

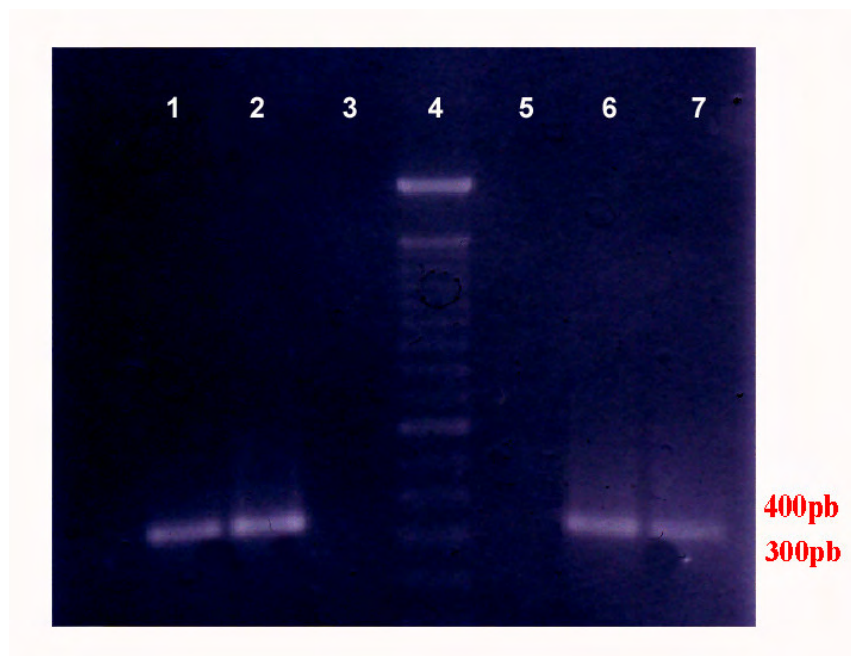
Todo en 30 ciclos totales.

Así mismo, en las siguientes fotografías se aprecia el resultado de las curvas de ADN y de Magnesio. Ambos factores han sido determinantes en la obtención de productos limpios y aptos para su posterior secuenciamiento y análisis.



Fotografía 1. Corrida electroforética de curva de material genético en gel de Agarosa al 1.5 %. Carriles 1 al 8: 10 ng, 20 ng, 40 ng, control negativo de primer evento de amplificación, marcador, control negativo de segundo evento de amplificación, 50 ng y 100 ng respectivamente. El producto es señalado con la flecha.

El sistema de amplificación mostró producto desde 10ng/ul hasta 100 ng/ul en 20ul de reacción. Como se aprecia a partir de 50 ng/ul la banda es mas intensa y el barrido no es tan pronunciado como en el producto de 100 ng/ul. De aquí se determinó que se trabajaría con una concentración final de 2.5 ng/ul de material genético por muestra.



Fotografía2. Corrida Electroforética de Curva de Magnesio. Carriles 1 a 7: 2mM, 3mM, Control negativo de primer evento de amplificación, marcador, control negativo de segundo evento de amplificación, 4mM y 5mM. Donde no se aprecia banda no hay producto.

Las concentraciones de reactivos de la mezcla maestra son las mismas que se emplearon en la curva del material genético. La presente curva evaluó la concentración de Magnesio en el segundo evento de PCR. Como se aprecia, los productos son más limpios al usar concentraciones de Magnesio 2 mM y 3 mM. De esta manera se decidió que se emplearía una concentración de Cloruro de Magnesio 2mM para el segundo evento de PCR y 3mM en el primer evento ya que ello permite mayor limpieza en el amplificado final.

Finalmente, con las concentraciones de los componentes de la mezcla maestra establecidos para un volumen final de reacción de 20 ul fue posible obtener los productos deseados. La **TABLA 15** resume las concentraciones de los componentes por cada ciclo de amplificación.

TABLA 15: Concentración de los Reactivos de PCR

Reactivos PCR	Concentración Inicial	Concentración Final Primer Ciclo de Amplificación	Concentración Final Segundo Ciclo de Amplificación
Buffer PCR sin Mg	10X	1X	1X
Cl ₂ Mg	25 mM	3mM	2mM
dNTP	10 mM	0.2 mM	0.2mM
Cebador NeI	250 ng/ul	2.5 ng/ul	2.5 ng/ul
Cebador A/B	250ng/ul	2.5 ng/ul	2.5 ng/ul
Taq Pol	5 U/ul	0.025ng/ul	0.025 ng/ul

Con las condiciones de temperatura y concentración de material genético y magnesio establecidas se realizó la amplificación con todas las muestras bajo las condiciones que se resumen en la siguiente tabla.

TABLA 16: Condiciones de Amplificación de las Muestras COPRECOS para la Transcriptasa Reversa de VIH-1 subtipo B

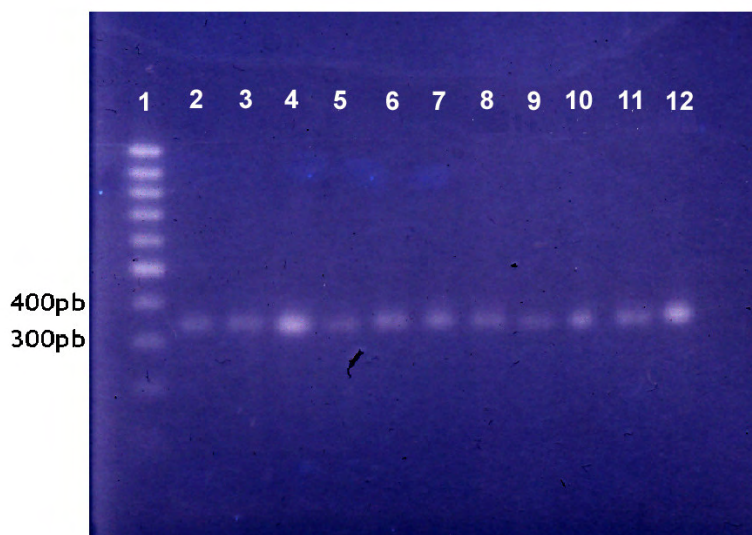
Muestra	Primer Round				Segundo Round				
	[Mg]=mM	[dNTP]=mM	[primers]=ng/ul	[DNA] _{final} =ng/ul	[Mg]=mM	[dNTP]=mM	[primers]=ng/ul	Vol DNA PCR I = uL*	
								PURO	1/10
CO2	3	0,2	250	2,5	2	0,2	250	-	2
CO5	3	0,2	250	2,5	2	0,2	250	-	2
CO7 *	3	0,2	250	2,5	2	0,2	250	-	1 **
CO9	3	0,2	250	2,5	2	0,2	250	-	2
CO14	3	0,2	250	2,5	2	0,2	250	-	2
CO15 ^E	3	0,2	250	2,5	2	0,2	250	1	-
CO18 ⁿ	3	0,2	250	2,5	2	0,2	250	1	-
CO19	3	0,2	250	2,5	2	0,2	250	1	-
CO21 ₂	3	0,2	250	2,5	2	0,2	250	1	-
CO22	3	0,2	250	2,5	2	0,2	250	1	-
CO25 *	3	0,2	250	2,5	2	0,2	250	-	2

* En 20ul de volumen final de reacción.

** 1 ul para 10 ul de volumen final de reacción.

VI.3.- La obtención de productos de PCR puro fue variable para cada muestra

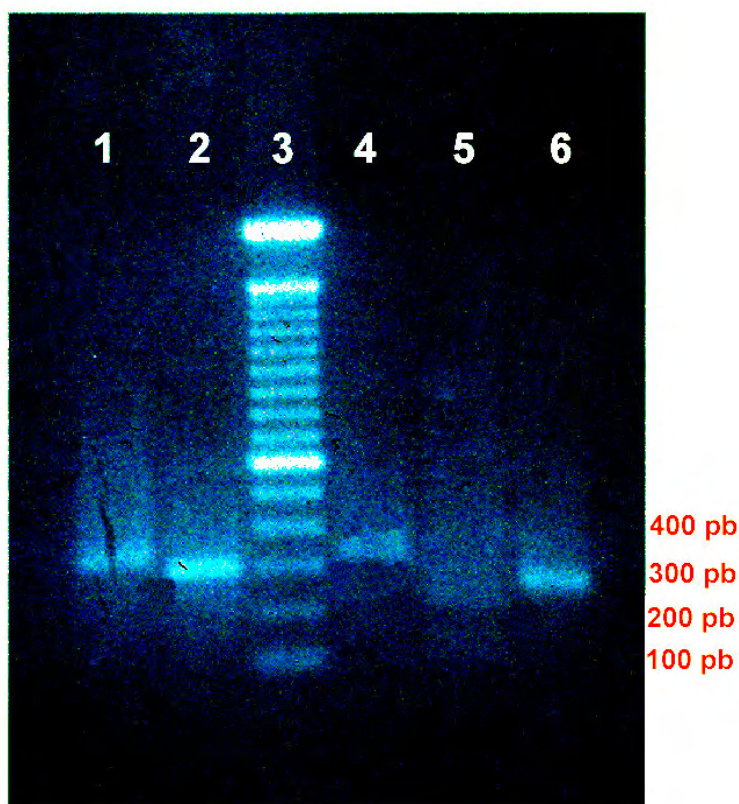
Las muestras con VIH-1, amplificadas y purificadas fueron corridas en gel de agarosa al 1.5 % y fotografiadas. Como se observa, algunas bandas son mas intensas que otras, esto podría deberse a que el cebador no tiene la misma efectividad en todas las muestras, ello es comprensible teniendo en cuenta la esperada variabilidad genética del virus que se evidencia aún en una población pequeña como la estudiada haciendo que algunas muestras sean mas eficazmente amplificadas que otras.



Fotografía 3. Corrida electroforética de todas las muestras purificadas. Carriles del 1 al 12: Marcador, CO2, CO5, CO7, CO9, CO14, CO15, CO18, CO19, CO21, CO22, CO25.

VI.4.- El ensayo de restricción así como el secuenciamiento de ADN confirmaron la identidad de la región amplificada

El ensayo de restricción con las enzimas seleccionadas reveló los productos de digestión esperados excepto para el caso de ALU I cuyo lote estaba fuera de fecha. Con ello se comprobó inicialmente que el amplificado era el requerido y no un artefacto.



Fotografía 4. Corrida electroforética de la prueba de restricción. Carriles 1 al 6: ALU I (no trabajó), PVU II (fragmento de 299 pb), marcador, Amp (sin enzima de restricción), Mbo I (fragmento de 217 pb y 105 pb), RSA I (fragmento de 269 pb).

Acercas del secuenciamiento, se obtuvieron las secuencias genéticas de las 11 muestras. El software empleado para obtener dichas secuencias fue ALFwin™ Sequence Analyser 2.10, software propio del secuenciador utilizado. Una vez obtenidas dichas secuencias estas se evaluaron haciendo uso del programa Mega BLAST disponible *online* en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Mega BLAST reportó hasta 98% en el Porcentaje máximo de identidad (datos no mostrados) respecto a otras Secuencias Codificantes Parciales (partial *CDS*) de la Transcriptasa Reversa de VIH-1 que ya han sido reportadas con anterioridad, con lo que se confirmó la identidad de las secuencias obtenidas.

En las secuencias presentadas a continuación, las letras en rojo indican los cebadores B (delantero) y NE1 (reverso) que flanquean la sección en estudio, las letras verdes indican variaciones en la muestra respecto al cebador empleado. Para todos los casos excepto la cepa referencial, el cebador resaltado en rojo es “B”.

>HXB2 (Cepa Patrón)

GGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAG
AAAACAAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACT
TAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAGCTGAGACAAACATCTGTTGAGGTGGGGA
CTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCTTTGGATGGGTTATGAACT
CCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAGAAAAAGA CAGCTGGACTGTCA
ATGACATACA

>C02

CATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAAACAAAATCCAGACATAGTAATCTATCAATACG
TGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGACAGCATAGAACAAAATAGAGGAA
CTGAGACAACATCTTTTGAGGTGGGGATTTACACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAAC
CCCATTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAAAGC
TGCCAGAAAAAGAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAGTTAGTAAAGAGC

>C05

TGACCAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAGAACAAAATCCAGATATAGTTA
TCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAGATAGGGCAACATAGAGAA
AAAATAGAGGAACTGAGAGAACATCTATTGAAGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAGCA
TCAGAAAGAACCTCCATTCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTAC
AGCCTATAGTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAA

>C07

ACAAAGCCATATTCCAAAGTAGCATGACAAAGATCTTAGAGCCTTTTAGGAAAC
AAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGGTCTGA
CTTAGAAATAGAGCAGCATAGAAGAAAAATAGAGGAACTGAGACAACACCTGT
TGAAGTGGGGACTTACTACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCCCCATTCC
TTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAATGCT
GCCAGAAAAAGAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAGTTAGTAAG

>C09

AGAGCCATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAACCTTTTAGAAAAACAA
AATCCAGACATGGTAATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACT
TAGAAATAGGGCAACATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTG
AAGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCTTT
TGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGAGCTG
CCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAGTTAGTAAG

>C014

ACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAACAAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGA
TGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAACATAGAACAAAAATAGAGGAATTGA
GACAACATCTGTTGAAGTGGGGGTTTACCACGCCAGACAAAAACATCAAAAAGAACCTCCA
TTCCTTTGGATGGGTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCC
AGAAAAGGA**CAGCTGGACTGTCAATGACATACA**GAAGTT

>C015

ACAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTCAGAAAACAGAATCCAGAAATAGTTATCTA
TCAATATATGGATGATTTGTATGTAGGGTCTGACTTAGAAATAGAACAACACAGAACGAAAA
TAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAACATCAG
AAAGAACCTCCATTCCCTTTGGATGGGTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCC
TATAATACTGCCAGAAAAAGA**CAGCTGGACTGTCAATGACATACA**GAAGTT

>C018

CAGAGCCATATTCCAAAGCAGCATGACAAAGATATTAGAGCCTTTTAGAAAACAAAATCCAG
ACATAGTTATCTATCAATACATAGATGATTTATATGTAAGATCTGACTTAGAAATAGGGCAG
CATAGAACAAAAATAGAAGAACTAAGACAGCATCTGTTGAAGTAAAGATTGACCACACCAGA
CAAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCCTTTAGATAAGTTATGAACTCCATCCTGATAAAT
AGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAGAAAAAGA**CAGCTGGACTGTCAATGACATACA**GAAG
TTAGTAAGA

>C019

TAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAACAAAATCCAGACATAGTTATCTATCAAT
ACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAACACAGAACAAGAGTAGAG
GAACTGAGACAACATCTGTTGAAGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGA
ACCTCCATTCTTTGGATGGGTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAG
TGCTGCCAGAAAAGGA**CAGCTGGACTGTCAATGACATACA**GAAGTTAGTAAGACTGGACT

>C021

TAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAACAAAATCCAGACCTAGTTATCTATCAAT
ACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAACATAGAACAAAAATAGAG
GAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGGTTTACTACACCAGATAAAAAACATCAAAAAGA
ACCTCCATTCCCTTTGGATGGGTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAG
AGCTGCCAGAAAAAGA**CAGCTGGACTGTCAATGACATACA**GAAGTTAGTAAGAG

>CO22

```
ATCCAAaGCCCTATTCCAAAGAAGCATGACAAAAATCTTGGAGCCTTTTAGAAAACAAAATC
CAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATCTATATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGTG
CAACATAGAATAAAAAATAGAGGAAGTGGAGACAACATCTGTTGAAGTGGGGATTTACCACACC
AGACAAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCTTTGGATGGGTATGAACTCCATCCTGATA
AATGGACAGTACAGCCTATAATGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACT
```

>CO25

```
GTAGCAATATTCCAATGTAGCATGACAAAGATTTTAGAGCCTTTTAGAAAACAAAACCCAGA
CATAGTTATCTATCAATACATAGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAACTAGGGAAGC
ATAGAGAGAAAGTAGAGGAAGTGGAGACAACATCTGTTAAAGTGGGGATTTACCACACCAGAC
AAAAAGCATCAGAAAGAACCGCCATTCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATG
GACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAAGT
TAGTAAG
```

VI.5.- El análisis de secuencias evidenció cambios aminoácídicos importantes en las muestras de pacientes infectados con VIH-1

VI.5.1.- La conversión de las secuencias de nucleótidos a Secuencias aminoácídicas reveló la presencia de codones de detención (*stop*)

A continuación se presentan los secuenciamientos y sus secuencias aminoácídicas en **naranja**, (-) simboliza un codón *stop*.

>HXB2

```
agcaatattccaaagtagcatgacaaaaatcttagagccttttagaaaaacaaaatccagac
  A I F Q S S M T K I L E P F R K Q N P D
atagttatctatcaatacatggatgatttgtatgtaggatctgacttagaaatagggcag
  I V I Y Q Y M D D L Y V G S D L E I G Q
catagaacaaaaatagaggagctgagacaacatctgttgaggtggggacttaccacacca
  H R T K I E E L R Q H L L R W G L T T P
gacaaaaaacatcagaaagaacctccattcctttggatgggttatgaactccatcctgat
  D K K H Q K E P P F L W M G Y E L H P D
aatggacagtacagcctatagtgctgccagaaaaaga
  K W T V Q P I V L P E K
```

>CO2

```
catgacaaaaatcttagagccttttagaaaaacaaaatccagacatagtaatctatcaatac
  M T K I L E P F R K Q N P D I V I Y Q Y
gtggatgatttgtatgtaggatctgacttagaaataggacagcatagaacaaaaatagag
  V D D L Y V G S D L E I G Q H R T K I E
gaactgagacaacatcttttgaggtggggattttacacaccagacaaaaaacatcagaaa
  E L R Q H L L R W G F Y T P D K K H Q K
gaacccccattcctttggatgggttatgaactccatcctgataaatggacagtagacgct
  E P P F L W M G Y E L H P D K W T V Q P
ataaagctgccagaaaaag
  I K L P E K
```

>C05

```
tgaccaaagtagcatgacaaaaatccttagagccttttagagaacaaaatccagatatagtt
D Q S S M T K I L E P F R E Q N P D I V
atctatcaatacatggatgatttgtatgtaggatctgacttagagatagggcaacataga
I Y Q Y M D D L Y V G S D L E I G Q H R
gaaaaaatagaggaactgagagaacatctattgaagtggggatttaccacaccagacaaa
E K I E E L R E H L L K W G F T T P D K
aagcatcagaaagaacctccattcctttggatgggttatgaactccatcctgataaatgg
K H Q K E P P F L W M G Y E L H P D K W
acagtacagcctatagtgtgctgccagaaaagga
T V Q P I V L P E K
```

>C07

```
acaaagccatattccaaagtagcatgacaaagatccttagagccttttaggaaacaaaatcca
K A I F Q S S M T K I L E P F R K Q N P
gacatagttatctatcaatacatggatgatttgtatgtagggtctgacttagaaatagag
D I V I Y Q Y M D D L Y V G S D L E I E
cagcatagaagaaaaatagaggaactgagacaacacctgttgaagtggggacttactaca
Q H R R K I E E L R Q H L L K W G L T T
ccagacaaaaaacatcagaaagaacccccattcctttggatgggttatgaactccatcct
P D K K H Q K E P P F L W M G Y E L H P
gataaatggacagtacagcctataatgctgccagaaaaaga
D K W T V Q P I M L P E K
```

>C09

```
agagccatattccaaagtagcatgacaaaaatccttagaaccttttagaaaacaaaatcca
R A I F Q S S M T K I L E P F R K Q N P
gacatggtaaatctatcaatacatggatgatttgtatgtaggatctgacttagaaataggg
D M V I Y Q Y M D D L Y V G S D L E I G
caacatagaacaaaaatagaggaactgagacaacatctgttgaagtggggatttaccaca
Q H R T K I E E L R Q H L L K W G F T T
ccagacaaaaaacatcagaaagaacctccattcctttggatgggttatgaactccatcct
P D K K H Q K E P P F L W M G Y E L H P
gataaatggacagtacagcctatagagctgccagaaaaaga
D K W T V Q P I E L P E K
```

>C014

```
acaaaaatccttagagccttttagaaaacaaaatccagacatagttatctatcaatacatg
T K I L E P F R K Q N P D I V I Y Q Y M
gatgatttgtatgtaggatctgacttagaaatagggcaacatagaacaaaaatagaggaa
D D L Y V G S D L E I G Q H R T K I E E
ttgagacaacatctgttgaagtgggggtttaccacgccagacaaaaaacatcaaaaagaa
L R Q H L L K W G F T T P D K K H Q K E
cctccattcctttggatgggttatgaactccatcctgataaatggacagtacagcctata
P P F L W M G Y E L H P D K W T V Q P I
gtgctgccagaaaagga
V L P E K
```

>C015

```
acaagtagcatgacaaaaatccttagagcctttcagaaaacagaatccagaaatagttatc
T S S M T K I L E P F R K Q N P E I V I
tatcaatatatggatgatttgtatgtagggtctgacttagaaatagaacaacacagaacg
Y Q Y M D D L Y V G S D L E I E Q H R T
aaaaatagaggaactgagacaacatctgttgaggtggggatttaccacaccagacaaaaaa
K I E E L R Q H L L R W G F T T P D K K
catcagaaagaacctccattcctttggatgggttatgaactccatcctgataaatggaca
H Q K E P P F L W M G Y E L H P D K W T
gtacagcctataatactgccagaaaaaga
V Q P I I L P E K
```

>C018

```
cagagccatattccaaagcagcatgacaaagatattagagccttttagaaaaacaaatcca
  R A I F Q S S M T K I L E P F R K Q N P
gacatagttatctatcaatacatagatgatttatgtgaagatctgacttagaaataggg
  D I V I Y Q Y I D D L Y V R S D L E I G
cagcatagaacaaaaatagaagaactaagacagcatctgttgaagtaaagattgaccaca
  Q H R T K I E E L R Q H L L K - R L T T
ccagacaaaaaacatcagaaagaacctccattccttttagataagttatgaactccatcct
  P D K K H Q K E P P F L - I S Y E L H P
gataaatagacagtagcgcctatagtgtgctgccagaaaaaga
  D K - T V Q P I V L P E K
```

>C019

```
tagcatgacaaaaatccttagagccttttagaaaaacaaatccagacatagttatctatcaa
  S M T K I L E P F R K Q N P D I V I Y Q
tacatggatgatttgtatgtaggatctgacttagaaatagggcaacacagaacaagagta
  Y M D D L Y V G S D L E I G Q H R T R V
gaggaactgagacaacatctgttgaagtggggatttaccacaccagacaaaaaacatcag
  E E L R Q H L L K W G F T T P D K K H Q
aaagaacctccatttctttggatgggttatgaactccatcctgataaatggacagtacag
  K E P P F L W M G Y E L H P D K W T V Q
cctatagtgtgctgccagaaaagga
  P I V L P E K
```

>C021

```
tagcatgacaaaaatccttagagccttttagaaaaacaaatccagacctagttatctatcaa
  S M T K I L E P F R K Q N P D L V I Y Q
tacatggatgatttgtatgtaggatctgacttagaaatagggcaacatagaacaaaaata
  Y M D D L Y V G S D L E I G Q H R T K I
gaggaactgagacaacatctgttgaggtgggggtttactacaccagataaaaaacatcaa
  E E L R Q H L L R W G F T T P D K K H Q
aaagaacctccattcctttggatgggttatgaactccatcctgataaatggacagtacag
  K E P P F L W M G Y E L H P D K W T V Q
cctatagagctgccagaaaaaga
  P I E L P E K
```

>C022

```
atccaaagccctattccaaagaagcatgacaaaaatcttggagccttttagaaaaacaaat
  S K A L F Q R S M T K I L E P F R K Q N
ccagacatagttatctatcaatacatggatgatctatatgtaggatctgacttagaata
  P D I V I Y Q Y M D D L Y V G S D L E I
gtgcaacatagaataaaaaatagaggaactgagacaacatctgttgaagtggggatttacc
  V Q H R I K I E E L R Q H L L K W G F T
acaccagacaaaaaacatcagaaagaacctccattcctttggatgggttatgaactccat
  T P D K K H Q K E P P F L W M G Y E L H
cctgataaatggacagtacagcctataatgtgtgccagaaaaagga
  P D K W T V Q P I M L P E K
```

>C025

```
gtagcaatattccaatgtagcatgacaaagatttttagagccttttagaaaaacaaaccca
  V A I F Q C S M T K I L E P F R K Q N P
gacatagttatctatcaatacatagatgatttgtatgtaggatctgacttagaactaggg
  D I V I Y Q Y I D D L Y V G S D L E I G
aagcatagagagaaagtagaggaactgagacaacatctgttaaagtggggatttaccaca
  K H R E K V E E L R Q H L L K W G F T T
ccagacaaaaagcatcagaaagaaccgccattcctttggatgggggtatgaactccatcct
  P D K K H Q K E P P F L W M G Y E L H P
gataaatggacagtacagcctatagtgtgctgccagaaaagga
  D K W T V Q P I V L P E K
```

Empleando el Software Clustal W se obtuvo el siguiente resultado:

[illegible]

68

VI.5.3.- El análisis de secuencias de VIH mediante el programa HIVdb Stanford confirmó la presencia de mutaciones relacionadas a resistencia

A continuación se presentan los resultados obtenidos del análisis de las secuencias genéticas mediante el programa online HIVdb Stanford, tal y como este los reporta, razón por la que está en su totalidad en inglés. El reporte del programa incluye:

- El porcentaje de similaridad con la cepa de referencia, confirmando de ésta forma el subtipo.
- Presencia o ausencia de codones stop o de cambios en el marco de lectura.
- Presencia de nucleótidos altamente ambiguos: N (indistinguible de A,C,G,T), B (contiene una combinación de C, G y T), D (contiene una combinación de A, G y T), H (contiene una combinación de A,C,T) y V (contiene una combinación de A, C y G).
- Residuos aminoacídicos inusuales, no considerados como mutaciones relacionadas a resistencia (posibles polimorfismos) si es que el software las encuentra en menos del 0,1 % de las secuencias publicadas del grupo M de VIH.
- Mutaciones de resistencia para NNRTI y NRTI.
- Gráfica de perfil de mutaciones en la sección analizada.
- Diagnóstico de susceptibilidad, mediana resistencia y alta resistencia a diferentes antiretrovirales.
- Comentarios que el software otorga en el caso de hallar mutaciones relacionadas a resistencia para ser tomadas en cuenta en el diagnóstico.

Todos estos resultados han sido compilados para su mejor comprensión en la **TABLA 17**, lo mismo que las gráficas del perfil de mutaciones han sido puestas en la figura 20.

SeqID: CO2_1 Date: 11 nov

Summary Data

Sequence includes RT: codons: 164 - 249

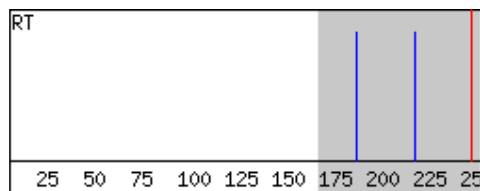
There are no insertions or deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

1. RT: B (95.7%)

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
RT	Stop Codons, Frame Shifts:	None
RT	B,D,H,V,N:	None
RT	Unusual Residues:	245



*Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance.
Red lines indicate QA problems.*

Drug Resistance Interpretation

NRTI Resistance Mutations: **M184V, T215Y**

NNRTI Resistance Mutations: None

RT Other Mutations: V245K

Nucleoside RTI		Non-Nucleoside RTI	
3TC	High-level resistance	DLV	Susceptible
ABC	Intermediate resistance	EFV	Susceptible
AZT	Low-level resistance	NVP	Susceptible
D4T	Low-level resistance		
DDI	Low-level resistance		
FTC	High-level resistance		
TDF	Potential low-level resistance		

RT Comments

- M184V/I cause high-level resistance to 3TC and FTC. It causes low-level in vitro resistance to ddI and ABC. However, it has not been shown to limit the effectiveness of ddI and it has been shown to limit the effectiveness of ABC only when it occurs in combination with multiple TAMs. M184V partially reverses T215Y-mediated resistance to AZT, TDF, and d4T.
- T215Y/F cause AZT and D4T resistance and limits the effectiveness of ABC, ddI, and TDF particularly when it occurs in combination with M41L and L210W. 215S/C/D/E/I/V represent transitions between wild type and the mutations Y and F. Most of these have do not decrease drug susceptibility. But their presence suggests that a resistant virus that harbors T215Y or F may have been transmitted.
- M184V partially reverses AZT, d4T, and TDF resistance caused by other TAMs.

SeqID: CO5_1 Date: 11 nov

Summary Data

Sequence includes RT: codons: 161 - 249

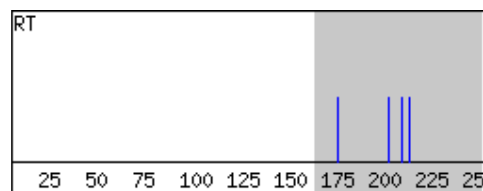
There are no insertions or deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

1. *RT: B (95.1%)*

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
RT	Stop Codons, Frame Shifts:	None
RT	B,D,H,V,N:	None
RT	Unusual Residues:	None



*Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance.
Red lines indicate QA problems.*

Drug Resistance Interpretation

NRTI Resistance Mutations: None

NNRTI Resistance Mutations: None

RT Other Mutations: K173E, T200E, Q207E, R211K

Nucleoside RTI		Non-Nucleoside RTI	
3TC	Susceptible	DLV	Susceptible
ABC	Susceptible	EFV	Susceptible
AZT	Susceptible	NVP	Susceptible
D4T	Susceptible		
DDI	Susceptible		
FTC	Susceptible		
TDF	Susceptible		

RT Comments

None

SeqID: CO7_1 Date: 11 nov

Summary Data

Sequence includes RT: codons: 158 - 249

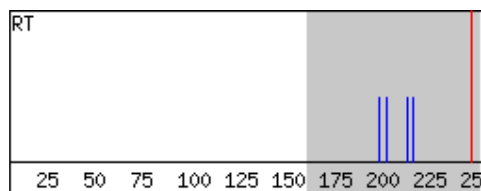
There are no insertions or deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

1. RT: B (95.7%)

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
RT	Stop Codons, Frame Shifts:	None
RT	B,D,H,V,N:	None
RT	Unusual Residues:	245



*Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance.
Red lines indicate QA problems.*

Drug Resistance Interpretation

NRTI Resistance Mutations: None

NNRTI Resistance Mutations: None

RT Other Mutations: G196E, T200R, R211K, F214L, V245M

Nucleoside RTI		Non-Nucleoside RTI	
3TC	Susceptible	DLV	Susceptible
ABC	Susceptible	EFV	Susceptible
AZT	Susceptible	NVP	Susceptible
D4T	Susceptible		
DDI	Susceptible		
FTC	Susceptible		
TDF	Susceptible		

RT Comments

None

SeqID: CO9_1 Date: 11 nov

Summary Data

Sequence includes RT: codons: 158 - 249

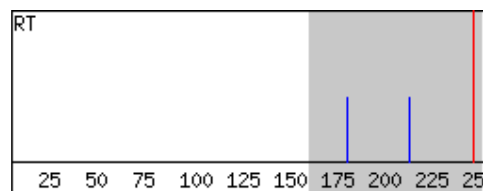
There are no insertions or deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

1. *RT: B (96.7%)*

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
RT	Stop Codons, Frame Shifts:	None
RT	B,D,H,V,N:	None
RT	Unusual Residues:	245



*Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance.
Red lines indicate QA problems.*

Drug Resistance Interpretation

NRTI Resistance Mutations: None
NNRTI Resistance Mutations: None
RT Other Mutations: I178M, R211K, V245E

Nucleoside RTI		Non-Nucleoside RTI	
3TC	Susceptible	DLV	Susceptible
ABC	Susceptible	EFV	Susceptible
AZT	Susceptible	NVP	Susceptible
D4T	Susceptible		
DDI	Susceptible		
FTC	Susceptible		
TDF	Susceptible		

RT Comments

None

SeqID: CO14_1 Date: 11 nov

Summary Data

Sequence includes RT: codons: 165 - 249

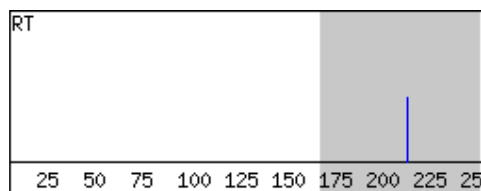
There are no insertions or deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

1. *RT: B (96.5%)*

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
RT	Stop Codons, Frame Shifts:	None
RT	B,D,H,V,N:	None
RT	Unusual Residues:	None



*Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance.
Red lines indicate QA problems.*

Drug Resistance Interpretation

NRTI Resistance Mutations:	None
NNRTI Resistance Mutations:	None
RT Other Mutations:	R211K

Nucleoside RTI	
3TC	Susceptible
ABC	Susceptible
AZT	Susceptible
D4T	Susceptible
DDI	Susceptible
FTC	Susceptible
TDF	Susceptible

Non-Nucleoside RTI	
DLV	Susceptible
EFV	Susceptible
NVP	Susceptible

RT Comments

None

SeqID: CO15_1 Date: 11 nov

Summary Data

Sequence includes RT: codons: 162 - 249

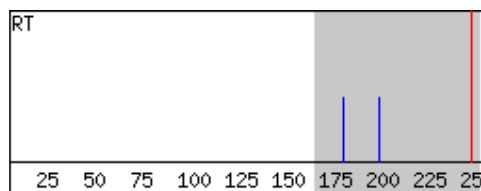
There are no insertions or deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

1. *RT: B (94.7%)*

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
RT	Stop Codons, Frame Shifts:	None
RT	B,D,H,V,N:	None
RT	Unusual Residues:	245



*Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance.
Red lines indicate QA problems.*

Drug Resistance Interpretation

NRTI Resistance Mutations:	None
NNRTI Resistance Mutations:	None
RT Other Mutations:	D177E, G196E, V245I

Nucleoside RTI		Non-Nucleoside RTI	
3TC	Susceptible	DLV	Susceptible
ABC	Susceptible	EFV	Susceptible
AZT	Susceptible	NVP	Susceptible
D4T	Susceptible		
DDI	Susceptible		
FTC	Susceptible		
TDF	Susceptible		

RT Comments

None

SeqID: CO18_1 Date: 11 nov

Summary Data

There are no insertions or deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

SeqID: CO19_1 Date: 11 nov

Summary Data

Sequence includes RT: codons: 163 - 249

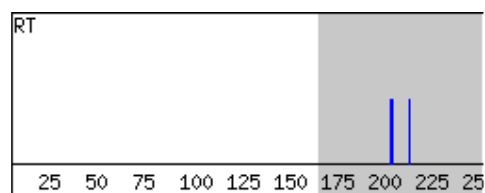
There are no insertions or deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

1. RT: B (96.6%)

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
RT	Stop Codons, Frame Shifts:	None
RT	B,D,H,V,N:	None
RT	Unusual Residues:	None



*Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance.
Red lines indicate QA problems.*

Drug Resistance Interpretation

NRTI Resistance Mutations: None
NNRTI Resistance Mutations: None
RT Other Mutations: K201R, I202V, R211K

Nucleoside RTI		Non-Nucleoside RTI	
3TC	Susceptible	DLV	Susceptible
ABC	Susceptible	EFV	Susceptible
AZT	Susceptible	NVP	Susceptible
D4T	Susceptible		
DDI	Susceptible		
FTC	Susceptible		
TDF	Susceptible		

SeqID: CO21_1 Date: 11 nov

Summary Data

Sequence includes RT: codons: 163 - 249

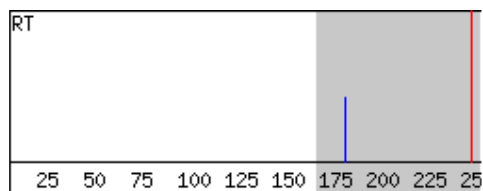
There are no insertions or deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

1. RT: B (96.6%)

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
RT	Stop Codons, Frame Shifts:	None
RT	B,D,H,V,N:	None
RT	Unusual Residues:	245



*Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance.
Red lines indicate QA problems.*

Drug Resistance Interpretation

NRTI Resistance Mutations: None

NNRTI Resistance Mutations: None

RT Other Mutations: I178L, V245E

Nucleoside RTI		Non-Nucleoside RTI	
3TC	Susceptible	DLV	Susceptible
ABC	Susceptible	EFV	Susceptible
AZT	Susceptible	NVP	Susceptible
D4T	Susceptible		
DDI	Susceptible		
FTC	Susceptible		
TDF	Susceptible		

RT Comments

None

SeqID: CO22_1 Date: 11 nov

Summary Data

Sequence includes RT: codons: 156 - 249

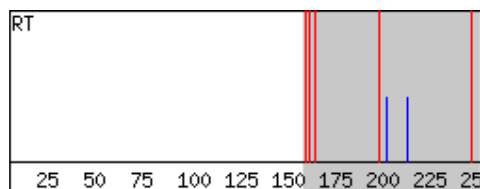
There are no insertions or deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

1. RT: B (94.0%)

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
RT	Stop Codons, Frame Shifts:	None
RT	B,D,H,V,N:	None
RT	Unusual Residues:	157,159,162,196,245



*Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance.
Red lines indicate QA problems.*

Drug Resistance Interpretation

NRTI Resistance Mutations: None

NNRTI Resistance Mutations: None

RT Other Mutations: P157K, I159L, S162R, G196V, T200I, R211K, V245M

Nucleoside RTI		Non-Nucleoside RTI	
3TC	Susceptible	DLV	Susceptible
ABC	Susceptible	EFV	Susceptible
AZT	Susceptible	NVP	Susceptible
D4T	Susceptible		
DDI	Susceptible		
FTC	Susceptible		
TDF	Susceptible		

SeqID: CO25_1 Date: 11 nov

Summary Data

Sequence includes RT: codons: 158 - 249

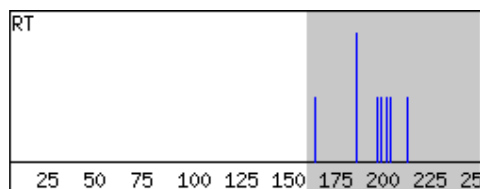
There are no insertions or deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

1. RT: B (93.1%)

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
RT	Stop Codons, Frame Shifts:	None
RT	B,D,H,V,N:	None
RT	Unusual Residues:	None



Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance.
Red lines indicate QA problems.

Drug Resistance Interpretation

NRTI Resistance Mutations: M184I

NNRTI Resistance Mutations: None

RT Other Mutations: S162C, I195L, Q197K, T200E, I202V, R211K

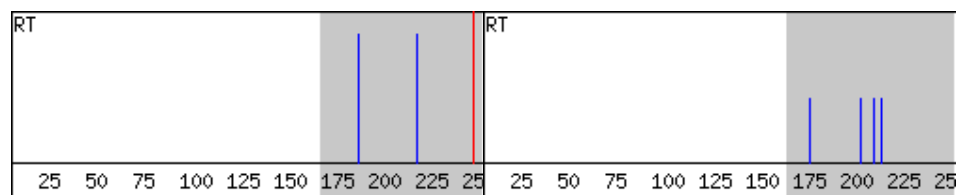
Nucleoside RTI		Non-Nucleoside RTI	
3TC	High-level resistance	DLV	Susceptible
ABC	Potential low-level resistance	EFV	Susceptible
AZT	Susceptible	NVP	Susceptible
D4T	Susceptible		
DDI	Susceptible		
FTC	High-level resistance		
TDF	Susceptible		

RT Comments

- M184V/I cause high-level resistance to 3TC and FTC. It causes low-level in vitro resistance to ddI and ABC. However, it has not been shown to limit the effectiveness of ddI and it has been shown to limit the effectiveness of ABC only when it occurs in combination with multiple TAMs. M184V partially reverses T215Y-mediated resistance to AZT, TDF, and d4T.

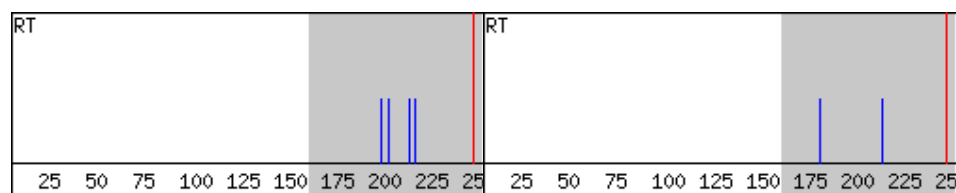
CO2

CO5



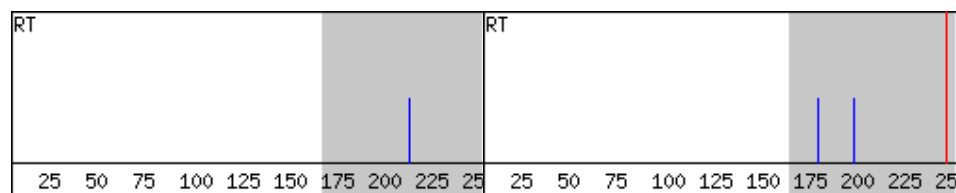
CO7

CO9



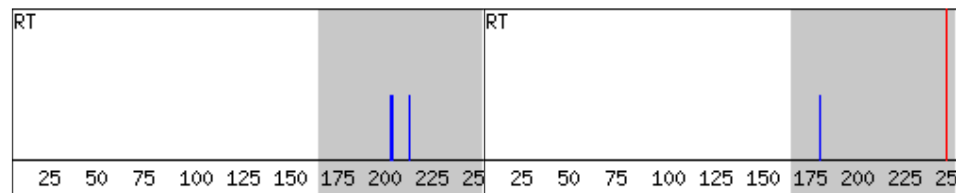
CO14

CO15



CO19

CO21



CO22

CO25

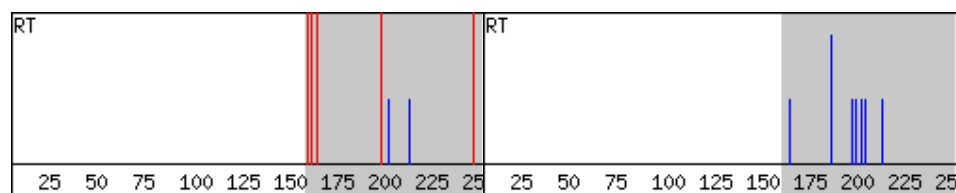


Figura 20. Gráficas del perfil de mutaciones reportado por el software HIVdb Stanford para cada muestra. En cada caso, los números representan posición en codones, el espacio gris señala el rango de codones en el que se ha hecho el análisis, y las líneas en azul señalan la posición de las mutaciones encontradas respecto a la base de datos, tales mutaciones no son identificadas necesariamente de resistencia como es el caso de la mutación S162C en la muestra CO25 o D177E en CO15. Las líneas rojas representan otras mutaciones que el programa identifica como mutaciones atípicas que no coinciden con la cepa de referencia. CO18 no registra gráfica al ser sometida al análisis con HIV db program siendo considerada por este como muy cercana a su base de datos, razón por la que no señala diferencia alguna.

TABLA 17: Mutaciones Identificadas entre las posiciones 151 a 261 del gen de la Transcriptasa Reversa de VIH-1 Subtipo B en pacientes que ya reciben Tratamiento Antiretroviral (TARV)

Muestra	Tratamiento actual del paciente	Tipo de ARV	Mutaciones Identificadas por el Software	ARV	Interpretación de Resistencias
CO2	†Combivir *Nelfinavir	†INTR *IP	M184V, T215Y V245K	†AZT, D4T, TDF	BAJA
				†DDI, ABC	INTERMEDIA
				†3TC, FTC	ALTO
				**DLV	NINGUNA
				**EFV	NINGUNA
				**NVP	NINGUNA
CO5	†Combivir *Nelfinavir	†INTR *IP	K173E, T200E, Q207E, R211K	3TC, ABC, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV, EFV, NVP	NINGUNA
				AZT	Compensatoria
CO7	†Combivir **Efavirenz	†INTR **INN TR	G196E, T200R, R211K, F214L, V245M	3TC, ABC, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV,	NINGUNA
				AZT	Compensatoria
				EFV, NVP	Grado de resistencia no determinado
CO9	†Combivir **Efavirenz	†INTR **INN TR	I178M, R211K, V245E	3TC, ABC, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV, EFV, NVP	NINGUNA
				AZT	Compensatoria
CO14	**Efavirenz *Kaletra	**INN TR *IP	R211K	3TC, ABC, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV, EFV, NVP	NINGUNA
				AZT	Compensatoria
CO15	Efavirenz * Kaletra	**INN TR *IP	D177E, G196E, V245I	3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV	NINGUNA
				EFV, NVP	Grado de resistencia no determinado
CO18	†Combivir *Nelfinavir	†INTR *IP	-	3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV, EFV, NVP	NINGUNA
CO19	†Combivir **Efavirenz	†INTR **INN TR	K201R, I202V, R211K	3TC, ABC, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV, EFV, NVP	NINGUNA
				AZT	Compensatoria
CO21	†Combivir * Kaletra	†INTR *IP	I178L, V245E	3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV, EFV, NVP	NINGUNA
CO22	†Didanosina Zidovudina **Efavirenz	†INTR **INN TR	P157K, I159L, S162R, G196V, T200I, R211K, V245M	3TC, ABC, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV,	NINGUNA
				EFV, NVP	Grado de resistencia no determinado
				AZT	Compensatoria
CO25	†Combivir * Kaletra	†INTR *IP	M184I	3TC, FTC	ALTA
				ABC, DDI	BAJA
			S162C, I195L, Q197K, T200E, I202V, R211K	3TC, ABC, D4T, DDI, FTC, TDF, DLV, EFV, NVP	NINGUNA
				AZT	Compensatoria

†INTR: Inhibidor Nucleósido o Nucleótido de la Transcriptasa Reversa. **INNTR: Inhibidor No Nucleósido o No Nucleótido de la Transcriptasa Reversa. *IP: Inhibidor de Proteasa. Combivir : AZT + 3TC. Kaletra : Lopinavir + Ritonavir. Lo resaltado en negrita son mutaciones relacionadas a resistencia. Se resaltan en **lila** las mutaciones compensatorias.

3TC Lamivudina. ABC Abacavir. AZT Zidovudina. D4T Stavudina. DDI Didanosina. FTC Emtricitabina. TDF Tenofovir. DLV Delavirdina. EFV Efavirenz. NVP Neviparina. TR Transcriptasa Reversa

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la presente investigación se lograron identificar mutaciones relacionadas a resistencia a antirretrovirales genotipificando una sección del gen de la Transcriptasa Reversa proveniente de pacientes en tratamiento. La región que ha sido genotipificada fue analizada previamente y reportada por Boden et al., 1999, lo mismo que el equipo de Willson en el 2000. Se trabajó aproximadamente entre las posiciones 151 a 261 con el fin de encontrar mutaciones conocidas por conferir alta resistencia tales como L210W o T215Y/F (esta última fue encontrada en la muestra CO2) causantes de resistencia a Zidovudina. Adicionalmente, ésta región es conocida por albergar otras mutaciones de resistencia importantes como G151M que asociada a F77L y F116Y causan multidrogoresistencia (Pellegrin et al 1999). Asimismo otras mutaciones importantes han sido encontradas en esta región como es el caso de K219 Q/E, la cual es conocida por otorgar resistencia a los INTR (inhibidores nucleósidos – nucleótidos de la Transcriptasa Reversa), y las mutaciones Y181C/I, G190S/A y M230L que invalidan la acción de los INNTR (inhibidores no nucleósidos – nucleótidos de la Transcriptasa reversa) que hoy se comercializan (Arrizabalaga et al. 2002). Casi todas las mutaciones de resistencia a drogas conocidas han sido encontradas en la región 5' codificante del Gen Pol, que es además la región secuenciada por la mayoría de laboratorios clínicos de los cuales se tienen las referencias en las bases de datos del Software HIV db Stanford (Kantor et al 2001). Es así que la región de 339 pb estudiada en la presente tesis es importante porque provee información de acerca de las mutaciones caracterizadas hasta el día de hoy.

La concentración de material genético , cloruro de magnesio y temperatura de alineamiento fueron determinantes en la estandarización del sistema de PCR

Un aspecto técnico imprescindible para obtener la información genética de resistencia fue el proceso de estandarización del sistema de PCR para su posterior análisis y deducción de marcos de lectura.

En ese sentido se consideró necesario contar con ADN químicamente puro y libre de ADNasas razón por la cual se trabajó con material genético total. El kit de extracción de ADN QIAGEN obtiene ambas moléculas, ADN y ARN en simultáneo. De querer purificar sólo ADN hubiese sido necesario utilizar otra metodología como el empleo de ARNasas, sugerido por el fabricante, no obstante ello suponía la extracción de las enzimas una vez realizado el proceso con la consiguiente posible pérdida y /o deterioro del ADN de interés. Adicionalmente es importante considerar la baja población de células CD4 (fuente del ADN) por paciente,

debido a la actividad replicativa del virus, lo cual podría ser crítico para la amplificación del gen de la transcriptasa reversa. Esto es apreciable en algunos conteos de células CD4/CD8 muy por debajo de lo usual (200 cel/ul) como se observa en el paciente CO25 que ostenta 34 cel/ul o en CO15 con 21 cel/ul y su correspondiente elevado número de copias en el conteo de carga viral (ver **TABLA 8**).

Conocer la cantidad de material genético que cada muestra ofrecía era necesario a fin de establecer la cantidad mínima requerida de material genético para el estudio de genotipificación. En ese sentido la cuantificación del material fue de vital importancia para estandarizar el sistema de PCR, de esa forma fue posible saber que el sistema amplificaba desde 10 ng hasta 100 ng de material genético en 20 ul de reacción (fotografía 1). Es importante señalar que algunas muestras fueron amplificadas a partir de 2 ul de producto de amplificación proveniente del primer PCR excepto CO2, CO5, CO7, CO9, CO14 y CO25. Para el caso de estas últimas muestras, fue necesario hacer diluciones del producto del primer ciclo de amplificación (1/10, 1/50 y 1/100) a fin de que este sea utilizable como ADN molde para el segundo evento de PCR. Estos hallazgos sugieren que ciertos componentes químicos presentes en la reacción del primer PCR podrían haber estado generando inhibición durante la reacción de amplificación. No obstante, algunas muestras sí pudieron ser amplificadas a partir de productos puros, como fue el caso de CO15, CO18, CO19, CO21 y CO22 (ver **TABLA 16**).

A fin de realizar una estandarización de manera uniforme, todas las muestras fueron procesadas haciendo las respectivas diluciones obteniendo el producto esperado libre de dímeros de cebadores y bandas inespecíficas (ver fotografía 4). Las diluciones del ADN obtenido por el primer Ciclo de Amplificación de PCR se hicieron con el fin de evitar un exceso de material genético amplificado que genere inhibición en el sistema y/o para evitar la acción de alguna nucleasa que pudiera haber ingresado en alguna parte del proceso. Usando el producto sin diluir el resultado era un marcado barrido (*snearing*) que incluso hacía pensar que la muestra podría estar degradada (datos no mostrados).

Es también resaltable el hecho de que el producto de amplificación final (del segundo ciclo de amplificación) requirió de una concentración más baja de magnesio para la obtención de productos de PCR con menor *snearing*. Al respecto, es probable que la aparición de *snearing* en los productos de PCR se deba al exceso de magnesio proveniente del primer Ciclo de Amplificación de PCR (ver fotografía 2).

Así mismo, es notable el que haya sido necesario reajustar la temperatura de alineamiento para las reacciones de PCR, 5 °C por encima de lo descrito en la literatura. Ello aseguró el correcto

funcionamiento de los cebadores, ello podría tomarse como un indicio indicador de la variabilidad de la región en estudio.

La genotipificación de una secuencia parcial de la Transcriptasa Reversa identificó la presencia de mutaciones primarias y complementarias relacionadas a resistencia a antiretrovirales

Una vez estandarizado el PCR fue posible la posterior genotipificación de la secuencia parcial del gen de la Transcriptasa Reversa del VIH-1 Subtipo B. Por cada muestra se hicieron hasta tres repeticiones de secuenciamiento a fin de corroborar las mutaciones encontradas, es resaltable el hecho de que en algunos casos los electroferogramas mostraron picos sobrepuestos, como pasó con CO22 y CO25 lo que sugiere que en estas muestras habría diversidad genética en coexistencia y en desarrollo. El análisis de comparación de secuencia demostró que estas especies de VIH solo se diferenciaron en algunos nucleótidos los cuales en su mayoría fueron cambios de tipo silencioso (datos no mostrados) demostrando el proceso evolutivo del VIH dentro de una misma persona y evidenciable mediante genotipificación.

En las muestras analizadas, las mutaciones directamente implicadas con resistencia reconocidas por el software HIVdb Stanford fueron: M184V y T215Y. Ambas han sido reportadas como mutaciones primarias por Perno et al. en el 2002 al estudiar pacientes *naïves*, es decir, sin tratamiento previo, encontrando dichas mutaciones separadas en algunos pacientes y juntas en otros, tal y como se halló en la muestra CO2.

Se sabe que M184V proporciona resistencia a 3TC y además afecta la síntesis del ADN viral (Xin et al 2003), en tanto que T215Y confiere resistencia a AZT. CO25 mostró un genotipo altamente resistente a 3TC y FTC mediante la mutación M184I, la que adicionalmente contribuye a la variabilidad genética al incrementar la frecuencia del cambio de vía de la TR entre los moldes de ARN viral (Nikolenko et al. 2004). Por otra parte, CO22, a pesar de su marcado polimorfismo (ver **TABLA 17**), no exhibe mutaciones de resistencia primaria, sin embargo, posee entre otras, la mutación compensatoria R211K la cual eleva la resistencia del virus cuando está aliada a algún genotipo resistente a AZT (Stürmer et al 2003). La misma mutación se encuentra en las muestras CO5, CO7, CO9, CO14, CO19, CO22 y CO25.

El caso de CO7 es resaltante pues posee cambios compensatorios en las posiciones 211 y 214 (R211K y F214L) las que se sabe son críticas en la resistencia a AZT (Stürmer et al 2003), uno de los medicamentos que el paciente en mención ya recibía al momento de la toma de muestra. No obstante estas mutaciones compensatorias requieren de una mutación primaria que potenciar, misma que no fue identificada en la porción de la TR genotipificada. Así es que con

excepción de CO25 y CO2 ninguna otra muestra presentó genotipo altamente resistente en tanto que sus respectivas cargas virales mantienen altos conteos (ver **TABLA 8**).

Esto lleva a pensar que es necesaria una genotipificación que abarque en lo posible el gen completo o en su defecto las zonas en las que se conoce la existencia de alta incidencia de mutaciones, a saber : 41, 44, 62, 65, 67, 69,70, 74, 75, 7, 115, 116, 118,151, 184, 210, 215 y 219 por resistencia a NRTI , los codones 98, 100, 101, 103, 106, 108, 179, 181, 188, 190, 225, 227, 230, 236 y 238 por resistencia a NNRTI (Rhee et al 2004) así como las posiciones complementarias 208, 211 y 214 (Stürmer et al 2003).

Otros polimorfismos encontrados en las muestras se ubicaron en las posiciones 162,173, 177, 178, 196, 200, 202, 207 y 245. De ellos, las variantes S162R/C y T200I/E se encontraron en CO22 y CO25, ésta última, T200I, en combinación con la mutación K219Q podría hacer decrecer la replicación del VIH-1 en el plasma y nodos linfáticos (Lafeuillade et al 1997), el hecho de no encontrarse K219Q podría explicar la aun alta carga viral de CO22.

De otro lado, el análisis de secuencia reveló la presencia de la mutación V245M/K/I/E la cual está presente en CO2, CO9, CO15, CO21 y CO22 y que ha sido identificada como una mutación inusual por el programa HIVdb. Al respecto cabae señalar que no es posible determinar la relevancia de la mutación en cuestión, sin embargo en esta misma posición se ha identificado la mutación V245Q la cual ha sido identificada mayoritariamente en VIH de subtipos diferentes de B y en recombinantes del mismo (Pérez Alvarez et al 2003). Estos datos sugieren que V245M/K/I/E podría ser también una mutación proveniente de alguna forma recombinante o especie de VIH de subtipo diferente, sin embargo se requiere profundizar el análisis de estas muestras para demostrar este hecho.

La mutación G196E/V presente en CO7, CO15 y CO22 se considera relacionado a resistencia a NNRTI junto con otras mutaciones como K101E/Q, K103N, V108I, Y181C, Y188L y G190A. Este grupo de mutaciones fue encontrado en 8 de 12 pacientes en tratamiento con Neviparina o bien con Efavirenz (Ochoa et al. 2005). Es probable que ello haya ocurrido en el caso de CO7, CO15 y CO22 pues estos reciben Efavirenz en su esquema de tratamiento, CO9, CO14 y CO19 no reportan tal mutación aún cuando reciben Efavirenz, pero comparten la mutación R211K cuyo efecto ya ha sido discutido.

CO18, por otra parte, ha sido la única muestra con codones de detención (codones *stop*) en su secuencia genética. El programa HIVdb no reporta ninguna mutación para esta muestra. Las posiciones 88, 212, 229 y 153 han sido reportadas por Makinson y colaboradores (2006) y concuerdan con lo hallado en CO18 en cuanto a los codones 212 y 229. Los codones *stop* han sido relacionados en el estudio de Makinson a la efectividad del TARGA hallándose en provirus de pacientes sin fracaso terapéutico. En nuestro caso, CO18 mantiene una alta carga

viral, lo contrario a lo reportado por Makinson y colaboradores. En nuestro análisis mediante el software HIV db de la Universidad de Stanford, CO18 fue reportada como muy cercana a la cepa de referencia, en ése sentido, éste secuenciamiento habría evidenciado un genotipo sensible al tratamiento antiretroviral que se encuentra almacenado en los linfocitos de donde ha sido extraído el material genético para el análisis. Esto hace pensar que el lugar de unión al cebador en la cepa dominante y en replicación estaría mutado, de forma que ha sido amplificada la secuencia silvestre que bajo la presión antiretroviral no es la responsable de la alta carga viral registrada al inicio del estudio. Este resultado señala que los primers empleados podrían tener una sensibilidad menor a lo esperado de manera que la recomendación respecto a CO18 es emplear cebadores más externos a la zona que ha sido genotipificada a fin de demostrar la presencia de mutaciones de resistencia en CO18. Otra alternativa es la de clonar el producto de amplificación de forma que se evidencie la producción de proteínas truncadas, resultado de los codones *stop* identificados en el secuenciamiento. Todo esto indica una vez más la necesidad de completar, con otros cebadores, el genotipificado total de la TR, no solo en el caso de CO18 sino también para las otras muestras.

El diagnóstico final debería incluir el resultado del análisis genotípico completo de la Proteasa y la Transcriptasa Reversa en simultáneo.

Es necesario resaltar que además del análisis de la TR es importante el estudio del gen de la proteasa el cual también brinda información importante para el análisis de resistencia durante el Tratamiento Antiretroviral de Gran Actividad (TARGA). En consecuencia este gen debe ser incluido en el análisis genotípico, siempre que se dé un diagnóstico final de la resistencia del VIH a antiretrovirales.

Al analizar conjuntamente la Transcriptasa Reversa y la Proteasa se aseguraría un esquema de medicamentos que permitiría optar por un tratamiento idóneo al perfil genotípico y de posibles resistencias determinadas en el laboratorio. Así tenemos que en el caso de la muestra CO2 se determinaron las mutaciones de resistencia M184V y T215Y las cuales confieren resistencia alta a 3TC y baja resistencia a AZT, medicamentos que el paciente ya recibía como terapia antiretroviral al iniciarse el estudio (en la **TABLA 8** aparece como Conbivir + Nelfinavir). Adicionalmente, el análisis del gen de la Proteasa demostró la presencia de las mutaciones D30N y N88D que se sabe confieren resistencia al NFV (Nelfinavir) (Yabar et al 2006), el cual coincidentemente era también uno de los medicamentos indicados al paciente CO2 y que exhibía una carga viral de 20638 a pesar de 2 años de tratamiento. En resumen, CO2 mantiene

una alta carga viral por tener mutaciones de resistencia a los tres antiretrovirales que consume como tratamiento. Así mismo, fue apreciable dentro de la misma muestra, la presencia de mutaciones compensatorias como la mutación T215Y de alto nivel de resistencia a Zidovudina y Stavudina (D4T), que estaría parcialmente revertida por la presencia de la mutación M184V, hallada en este paciente y que confiere resistencia a 3TC como se indica líneas arriba. Esta observación fue obtenida al procesar los datos con el programa HIV db.

Por otro lado, se ha encontrado por lo menos una de las mutaciones compensatorias R211K, F214L, G196E/V y el polimorfismo V245K/E/M/I en todas las muestras con excepción de CO18 (que aún en el gen de proteasa no reporta mutaciones primarias de resistencia) (Yabar et al 2006), justificando con ello los altos conteos de carga viral. No obstante es necesario recalcar nuevamente la necesidad de secuenciar el gen completo de la TR a fin de dar un diagnóstico más certero.

En el presente estudio se reporta una metodología que podrá formar parte de un sistema de genotipificación para el trabajo con la Transcriptasa Reversa de VIH-1 subtipo B. La sección estudiada, aunque pequeña, es significativa pues en ella se ubican mutaciones reconocidas ampliamente en la literatura como de resistencia a antiretrovirales y puede ser usada como monitoreo para poblaciones más grandes. Queda pendiente investigar el gen completo y relacionarlo con la Proteasa. En vista que ésta investigación se ha basado en una población pequeña (11 individuos) sin criterios estadísticos de representatividad numérica, los resultados obtenidos sólo pueden servir como referencia para implementar un estudio a escala mas alta incrementando mayor número de muestras a fin de obtener la frecuencia de las mutaciones con prevalencia en Lima y/o en el ámbito nacional. Todo éste proceso considerado dentro del marco de atención integral que las personas que viven con VIH-sida merecen.

VIII.- CONCLUSIONES FINALES

- La presente tesis demuestra que mediante la genotipificación de la porción de 339 pb del sitio catalítico de la transcriptasa reversa es posible identificar mutaciones relacionadas a resistencia a antiretrovirales, así como mutaciones compensatorias y polimorfismos que ya han sido reportados y cuyo efecto es conocido.
- Los resultados de la genotipificación realizada son, en su mayoría, relacionables cualitativamente con los elevados conteos de carga viral y bajos niveles de CD4/CD8 en las muestras estudiadas.
- La presencia de codón stop en la cepa CO18 no es un indicador absoluto de la eficacia del tratamiento antiretroviral
- La secuencia de 339 pb también brinda información sobre el subtipo de la cepa de VIH tal como fue demostrado usando el programa HIVdb

IX.- Recomendaciones

- Los primers empleados podrían tener una sensibilidad menor a la esperada tal y como se evidenció con CO18, por lo que deben emplearse otros primers y comparar resultados.
- Se recomienda el cambio de esquema en algunos pacientes en función a su cepa viral resistente.
- Si bien la región estudiada es de importancia, es necesario completar el estudio del gen completo de la Transcriptasa Reversa pues se hallaron mutaciones primarias y complementarias relacionadas a resistencia, sugiriendo mutaciones fuera de la sección genotipificada. La literatura reporta otras posiciones que podrían ser empleadas con tal fin.
- Se recomienda paralelamente analizar el gen de la proteasa durante la genotipificación de muestras de VIH para resistencia.

X.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alexander C.S., Dong W., Chan K.,Jhanke N., O' Shaughnessy M.V., Mo T., Piasecnezy M.A., et al. HIV protease and reverse transcriptase variation and therapy outcome in antiretroviral-naive individuals from a large North American cohort.AIDS 2001; 15:601-607.
2. Arrizabalaga J., Alcamí J., Dalmau D., Delgado R., Miró J.M., Soriano V., Herramientas de Laboratorio para individualizar el tratamiento: resistencias y niveles de fármacos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2002; 20(Supl.2):35-47.
3. Alon Herschhorn, Arie Admon, Amnon Hizi. Recombinant antibodies against the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type-1. Biochim Biophys Acta. 2003 May 30; 1648(1-2):154-63.
4. Amersham Biosciences. Termo Sequenase Cy5 Dye Terminador Cycle Sequencing Kit. Manual de Kit para secuenciar con el secuenciador Alf Expres DNA sequencer.
5. Boden D. Harley A.,Thang.L,Cao Y.,Jones E.,Tsay J.,Farthing C.,Limdi K.,Parkin N.,Markowitz M. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. JAMA 1999. 282(12).1135-1141.
6. Boyer P.L., Sarafianos S.G., Arnold E., and Hughes S.H. Analysis of mutations at positions 115 and 116 on the dNTP binding site of HIV-1 reverse transcriptase. PNAS 2000. (97) 7 3056-3061.
7. D'Aquila Richard T.; Schapiro J.; Brun-Veiznet F.; Clotet B.; Conway B.; Demeter L.; Grant R.; Jhonson V.; Kuritzkes D.; Loveday C.; Shafer R.; Richman D. Drug Resistance Mutations in HIV-1.Special Contribution. International AIDS Society USA. Topics in HIV Medicine.Volume 10. Issue 2 May/June 2002.
8. Delgado B. E. Resistencias fenotípicas en subtipos B y no B. SEISIDA .2003.14 (5):1-5.
9. Domingo Esteban. Rapid Evolution of RNA genomes. The Journal of Nutrition Vol. 127 No. 5 May 1997, pp. 958S-961S
10. EDVOTEK. RT-PCR: A model for the Molecular Biology of HIV Replication. EDVOTEK inc. 2000.
11. García Lerma Gerardo: Ileine walid. Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to reverse transcriptase and protease inhibitors: genotypic and phenotypic testing. Journal of Clinical Virology 21(2001) p 197-212.
12. García Vallejo Felipe, Dominguez Martha. La genotipificación y fenotipificación de la resistencia del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) a los fármacos antiretrovirales. Colombia Médica Vol.34 N°3, 2003, p 143-154.

13. Greenberg Michael L. and Cammack Nick. Resistance to Enfuvirtide ,the first HIV Fusion Inhibitor. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004 (54) ,p 333 – 340 .
14. Hironori Sato, Yasuhiro Tomita, Kayo Shibamura, Teiichiro Shiino, Tuyoshi Miyanakuni and Yutaka Takebe. Convergent evolution of Reverse Transcriptase(RT) Genes of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes E and B following Nucleoside Analogue RT Inhibitor Therapies. *J Virol* Jun 2000. Vol 74. N°11, p 5357 – 5362.
15. HIV Molecular Immunology 2005. Theoretical Biology and Biophysics. Los Alamos National Laboratory National Institute of health and Department of Health and Human Services. USA, 2005
16. Hjuler Nielsen Morten; Skou Pedersen Finn and Kjems Jorgen. Review: Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology*. BIOMed Central .2005, 2:10 .
17. ICASO. International Council of AIDS Service Organizations. Informe Monitoreo de la implementación del compromiso del UNGASS por el Perú. Un proyecto del Consejo Internacional de Organizaciones con Servicios en SIDA.Lima-Perú. Diciembre del 2005.
18. Jetzt Amanda., Yu Hong., Alarman G., Ron Y., Preston B., Dougherty j. High rate of recombination throughout the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome. *J Virol* feb 2000 Vol 74, N° 3, p 1234- 1240.
19. Julias J. G. ,Mc Williams M.J., Sarafianos S.G., Alvord W.G., Arnold E. Hughes H. Mutation of Amino Acids in the Connection Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase that Contact the Template-Primer Affects ARNse H activity. *J Virol* Aug 2003, 8548-8554.
20. Kantor R., Rhoderick M., Gonzales M., Dupnik K., Schapiro J., Shafer R. Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase and Protease Sequence Data Base: An expanded data model integrating natural language text and sequence analysis programs. *Nucleic Acid Research*, 2001, Vol.29, No1.
21. Kristiansen Thomas B.; Pedersen Anders G.;Eugen Olsen jesper; Katzenstein terese L.; & Lundgren Jens D. Genetic evolution of HIV in patients remaining on a stable HAART regimen despite insufficient viral suppression. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2005; 37: 890 – 901
22. Lafeuillade A.; Poggi C.; Djediouane A.; Chollet L.; Profizi N.; Sayada C. A pilot study of a combination of three reverse transcriptase inhibitors in HIV-1 infection. *Antiviral Therapy*. 1997 Dec; 2(4): p 219- 227.
23. Laguna Torres V. Alberto; Olson James; Sánchez José; Montano Silvia; Chauca Gloria; Carrión Gladys; Romero Ada; Rios Jane; Gamero Maria; Sovero Merly; Pérez Juan; Carr Jean y el Grupo de Trabajo de Genotipificación de VIH en Sudamérica. Distribución de los

- subtipos del VIH-1 en nueve países de América del Sur, 1995 – 2002. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública* 22(1), 2005
24. Lama JR, Sanchez J, Suarez L, Caballero P, Laguna A, Sanchez JL, Whittington WL, Celum C, Grant RM; Peruvian HIV Sentinel Surveillance Working Group. Linking HIV and antiretroviral drug resistance surveillance in Peru: a model for a third-generation HIV sentinel surveillance. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006 Aug 1;42(4):501-5.
 25. Luciw P.A. Human Immunodeficiency Virus and its replication. In *Field's Virology*, 3rd Edn. Ed. B.M. Fields pp 845- 897 .Lippincott Raven Publishers Philadelphia. 1996
 26. Makinson Alain, Masquelier Bernard, Taieb Audrey, Peytavin Gilles, Waldner-Combernoux Anne, Collin Gilles, Chêne Genevieve, Brun-Vézinet Françoise, Rafii François, Le Moing Vincent, Leport Catherine, Descamps Diane and the ANRS CO8 APROCO-COPILOTE Study Group. Research Letters. Presence of numerous stop codons in HIV-1 reverse transcriptase proviral DNA sequences from patients with virological response to HAART. *AIDS* 2006, 20:1327-1336.
 27. Miller Roger J., Cairos Scout, Briddes Sandra and Sarver Nava. Minireview: Human Immunodeficiency Virus and AIDS: Insights from Animal lentiviruses. *J. Virol* Vol 74 N° 16 , 7187 – 7195. 2000
 28. Ministerio de Salud. Norma Técnica para el Tratamiento Antiretroviral de Gran Actividad – TARGA en adultos infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. NT N° 2004-MINSA/DGSP-V.01. Dirección General de Salud de las Personas. Dirección Ejecutiva de atención integral de salud. 2004
 29. Miró José M.; Sued Omar; Plana Monserrat; Pumarola Tomás y Gallart Teresa. Avances en el diagnóstico y tratamiento de la infección aguda por el VIH-1. *enferm Ifecc Microbiol Clin* 2004; 22(1°); 643- 659.
 30. Nermut M. and Fassati A., Structural Analyses of Purified Human Immunodeficiency Virus type 1 Intracellular Reverse Transcription Complexes: *J. Virol*. Vol 77 N° 15, pp 8196 – 8206. Aug. 2003.
 31. Nikolenko G.; Svarovskaia E.; Delviks K.; and Pathak V. Antiretroviral Drug Resistance Mutations in Human IMMunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Increase Template-Switching Frequency. *Journal of virology*, Aug.2004, p. 8761 – 8770.
 32. Ochoa A.; Arnedo M.; Xercavins M.; Martinez E.; Rosón B.; Ribera E.; Domingo P.; Gonzales A.; Riera.; Llibre J.; Gatell J.; dalmáu D. Genotypic resistance patterns at virological failure in a simplification trial with nevirapine, efavirenz or abacavir. *AIDS* 2005, 19: pp1385-1391.

33. Oficina General de Epidemiología. Boletín epidemiológico mensual. Situación del VIH/sida en el Perú. Marzo del 2006.
34. Pellegrin I., Izopet J., Reynes J., Denayrolles M., Montes B. Emergence of Zidovudine and Multidrug-resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naïve patients receiving stavudine plus didanosine combination therapy. *AIDS* 1999; 13:1705-1709.
35. Pérez Alvarez L. ; Carmona R. ; Muñoz M. ; Delgado E. ; Thomsom M.; Contreras G. ; Pedreira JD. ; Rodríguez R. ; Vazques E. ; Medrano L. ; Taboada J. ; Najerar. ; Spanish group for antiretroviral resistance studies in Galicia. High Incidence of non-B and recombinant HIV-1 strains in newly diagnosed patients in Galicia, Spain : Study of genotypic resistance. *Antiviral Therapy* . 2003 Aug, 8(4) :p. 355-360.
36. Perno C.F., Cozzi-Lepri A., Balotta C., Bertoli A., Violin M., et al. Low prevalence of primary mutations associated with drug resistance in antiviral-naïve patients at therapy initiation. *AIDS* 2002; 16:619-624.
37. Persaud Deborah ; Zhou Yan ; Siliciano Janet M. ; Siliciano Robert F. Latency in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection : NO easy Answers. *Journal of Virology*, Feb. 2003, p 1659 – 1665.
38. QIAGEN. QIAamp 96 DNA Handbook for the high purification of DNA from whole blood, plasma, serum, body fluids, lymphocytes, bone marrow, cultured cells. 2005.
39. Rachlis Anita.R, Zarowny Donald P., Md; for the Canadian HIV Trials Network Antiretroviral Working Group. Guidelines for antiretroviral therapy for HIV infection. *CAMJ* 1998; 158(4):496-505.
40. Rhee Soo Yon; Liu T.; Ravela J.; Gonzales M.; Shafer R. Distribution of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease and Reverse Transcriptase Mutation patterns in 4183 persons undergoing genotypic resistance testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Aug. 2004. Vol48, N°8. p 3122-3126.
41. Russell KL., Carcamo C., Watts D.M., Sanchez J. Emerging Genetic Diversity of HIV-1 in South America. *AIDS* 2000 Aug. 18; 14 (12): 1785-1791.
42. ROCHE. Amplicor HIV-1 Monitor Test, Versión 1.5. Inserted Brochure
43. Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, .U.S.A. Ed 2nd.
44. Snoeck J., Riva C., Steegen K., Schrooten Y., Macs B., Vergne L., Van Lacthem K., Peeters M., Vandamme A.M. Optimization of a genotypic assay applicable to all human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase subtypes. *Journal of Virological Methods* 128 (2005) 47-53.

45. The Division of AIDS National Institute of Allergy & Infectious Diseases National Institute of Health and collaborative investigators. DAIDS Virology Manual for HIV laboratories. Jan 1997.
46. Stürmer M.; Staszewski S.; Wilhelm H.; Larder B.; Bloor S.; Hertogs K. Correlation of Phenotypic Zidovudine Resistance with Mutational Patterns in the Reverse Transcriptase of Human Immunodeficiency Virus Type 1: Interpretation of established mutations and Characterization of New Polymorphisms at codons 208, 211 and 214. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jan. 2003, P. 54-61.
47. Tural C., Ruiz L., Holtzer C., Schapiro J., Viciano P., González J., et al. Clinical Utility of HIV-1 Genotyping and expert advice: the Havana trial. *AIDS* 2002, 16:209-218.
48. Ugolini S., Mondor I., Sattentau Q., HIV-1 attachment: another look. *Elsevier science. Trends in Microbiology*. Vol7. No 4. 1999.
49. Wang J., Smerdon S., Jäger, Kohlstaedt L., Rice., Friedman and Steitz. Structural basis of asymmetry in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer. *Biochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 91, pp 7242-7246. Jul 1994.
50. Willson J., Bean P., Robins T., Graziano F. Comparative Evaluation of Three Human Immunodeficiency Virus Genotyping Systems: the HIV-GenotypR Method, the HIV PRT GeneChip Assay, and the HIV – 1 RT Line Probe Assay. *Journal of Clinical Microbiology* .Aug 2000, Vol38, No 8 . 3022 – 3028.
51. Xin W., Chen L., Götte M and Wainberg M. Negative effect of the M184V mutation in HIV-1 reverse transcriptase on initiation of viral DNA synthesis. *Virology* 311. pp 202 – 212. 2003.
52. Yabar C. Eventos Moleculares, Genéticos e Inmunológicos durante la Interacción VIH-Hombre. Tema de revisión. *Rev. Peru.Med.Exp.Salud Pública*. 2003. 20 (2).
53. Yabar C., Chávez P., Varas Z., Rodríguez R., Identificación molecular de mutaciones puntuales relacionadas a resistencia a drogas en VIH-1. Instituto Nacional de Salud. 2006

Recursos en la Web

1. CLUSTAL W
<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
2. HIV db Program Versión 4.1.2 de Stanford HIV RT and Protease Sequence Database
<http://hivdb.stanford.edu/>
3. OligoAnalyzer
<http://www.idtdna.com/SciTools/SciTools.aspx>
4. Prime Align
<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/PRIMALIGN/PRIME.html>
5. Restriction enzyme digest of DNA with all commercially available restriction enzymes
http://www.in-silico.com/s_restriction/
6. Translate Tool
<http://au.expasy.org/tools/ADN.html>